

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

par

Bernard MAUDINAS

Licencié ès-Sciences Physiques

Docteur de 3^e Cycle (mention Biochimie)

SUJET :

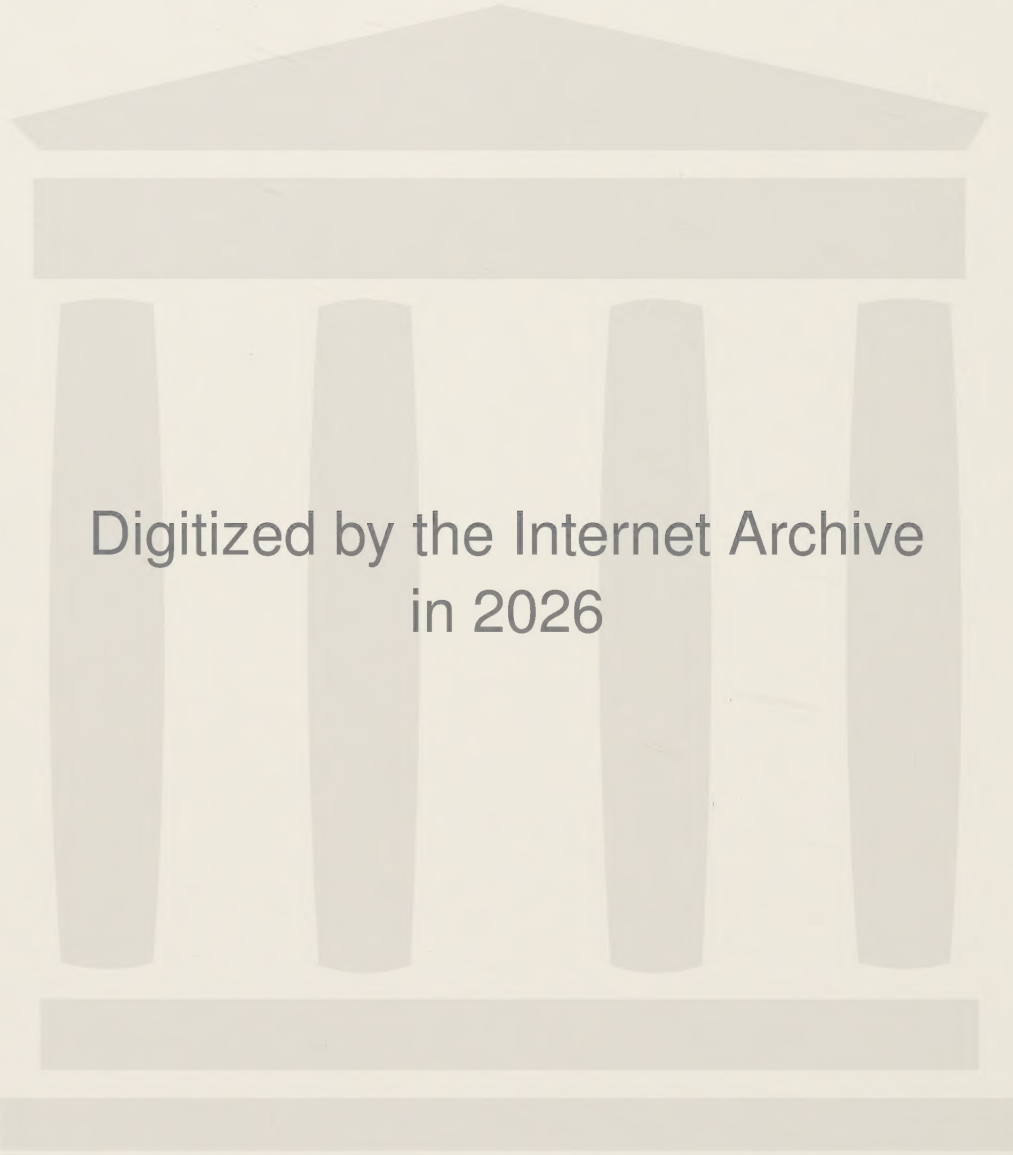
**Influence du 2-hydroxybiphényle sur la caroténogenèse
et la morphologie de *Rhodopseudomonas spheroides*
et de *Rhodospirillum rubrum***

Soutenue le 6 Mars 1973, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. R. GAY

Examineurs : { MM. H. DURANTON
J.-L. RIVAIL
J. VILLOUTREIX



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555419_0006

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

par

Bernard MAUDINAS

Licencié ès-Sciences Physiques
Docteur de 3^e Cycle (mention Biochimie)

SUJET :

**Influence du 2-hydroxybiphényle sur la caroténogenèse
et la morphologie de *Rhodopseudomonas spheroides*
et de *Rhodospirillum rubrum***

Soutenue le 6 Mars 1973, devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. R. GAY
Examineurs : { MM. H. DURANTON
J.-L. RIVAIL
J. VILLOUTREIX

A ma femme,

A notre fille,

A mes parents,

En témoignage de ma profonde affection

A V A N T - P R O P O S

Cette thèse a été réalisée dans le laboratoire de Chimie Biologique de Monsieur le Professeur PIERFITTE. Qu'il trouve ici l'expression de notre très sincère reconnaissance.

Ce travail nous a été proposé par Monsieur VILLOUTREIX, Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique et a été effectué sous sa bienveillante direction. Nous tenons à lui exprimer tout particulièrement l'assurance de notre respectueux attachement et de notre profonde gratitude pour le soutien qu'il nous a accordé, pour l'intérêt qu'il a constamment porté à nos recherches et pour la formation qu'il nous a permis d'acquérir.

Notre sincère gratitude va à Monsieur le Professeur GAY qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Nous n'avons pas oublié, qu'il a dirigé nos premiers pas dans la recherche et nous lui devons notre appartenance au Centre National de la Recherche Scientifique.

Nous exprimons également notre profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur DURANTON, de l'Institut de Botanique de Strasbourg qui, malgré ses nombreuses occupations, a toujours su nous témoigner beaucoup d'attention et nous a fait un grand honneur, en acceptant de juger notre travail.

Monsieur le Professeur RIVAIL voudra bien trouver ici notre témoignage de reconnaissance pour l'intérêt qu'il nous a porté en acceptant de juger notre thèse.

Nous adressons nos remerciements à Monsieur le Directeur Général du Centre National de la Recherche Scientifique pour l'aide

matérielle qu'il nous a accordée et à Monsieur GOUTAREL, Directeur Scientifique au Centre National de la Recherche Scientifique, qui a bien voulu accepter de nous parrainer devant cet organisme.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Messieurs les Professeurs BARRIOL, GRIGNON et NICLAUSE qui nous ont spontanément ouvert leur laboratoire. Nos remerciements vont aussi à Monsieur HELENE, Maître de Recherche au Centre de Biophysique moléculaire à Orléans et à Monsieur le Professeur DREWS de l'Institut de Microbiologie de Freiburg i. Br., qui nous ont fait bénéficier de leur vaste compétence scientifique et de leur soutien matériel indispensable.

Nous remercions également Monsieur GRANGER du laboratoire de Chimie théorique, Messieurs REISINGER et KILBERTUS du laboratoire de Microbiologie et tous les membres de l'équipe de photochimie du laboratoire de Chimie générale pour les travaux fructueux que nous avons réalisés ensemble.

Nous adressons aussi nos vifs remerciements à Mesdames CRAMER et SIMONETTI pour l'aide apportée dans nos travaux de microscopie électronique.

Ces témoignages de gratitude seraient incomplets si nos camarades de laboratoire n'y étaient associés ; leur coopération et l'excellente ambiance qu'ils ont su créer, ont facilité notre tâche.

Nous tenons ainsi à remercier Mademoiselle HERBER pour l'appui efficace qu'elle nous a constamment apporté. Nous ne saurions oublier les nombreux services, que nous ont rendus Messieurs BARRAT et GLARDON. Qu'ils trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

La dactylographie et la présentation de ce travail ont été effectuées grâce à la collaboration dévouée de Mesdames BODAUD, HAGNIER et MAIRE. Qu'elles reçoivent nos sincères remerciements.

A B R E V I A T I O N S

Pour alléger le texte, les abréviations suivantes ont été utilisées :

AMP	Adénosine phosphate-5'
ATP	Adénosine triphosphate-5'
Bchl	Bactériochlorophylle
EDTA	Ethylènediaminetétracétate
DPA	Diphénylamine
DO	Densité optique
EP	Ether de pétrole
ES	Ether sulfurique
Hz	Hertz
J	Constante de couplage
JV	Mutant jaune vert de Rps. sphéroïdes
NAD	Nicotinamide-adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH	Nicotinamide-adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP	Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate
2-OHBP	2-hydroxybiphényle
ppm	Parties par million
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rh. rubrum	Rhodospirillum rubrum
Rps. sphéroïdes	Rhodopseudomonas sphéroïdes
TMS	Tétraméthylsilane
Triton X-100	éter mono p (1,1,3,3 tétraméthyl butyl) phényl du polyéthylèneglycol
Tris	tris -(hydroxyméthyl) aminométhane
δ	Déplacement chimique
ϵ	Coefficient d'extinction molaire et qui sera toujours exprimé en $M^{-1} cm^{-1}$
λ	Longueur d'onde exprimée en nm
τ	Durée de vie, temps au bout duquel une propriété décroissant exponentiellement a diminué d'un facteur e.

S O M M A I R E

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I : MATERIELS ET TECHNIQUES</u>	13
I - Matériels	15
A - Microorganismes	15
B - Solvants	15
C - Adsorbants chromatographiques	15
II - Techniques	16
A - Cultures des bactéries	16
B - Incubation des bactéries non proliférantes	16
C - Inhibition et levée d'inhibition de la caroténogenèse	16
D - Extraction et séparation des caroténoïdes	17
E - Dosage des caroténoïdes	18
F - Détermination des ubiquinones	18
G - Détermination des lipides totaux et des phospholipides	19
H - Techniques spectroscopiques	20
I - Détermination des états métastables du phytoène	21
J - Microscopie électronique	21
K - Isolement et purification des chromatophores	22
L - Fonctionnement et extraction des chromatophores	22
M - Détermination de l'activité NADH oxydase	23
 <u>CHAPITRE II : INHIBITION DE LA CAROTENOGENESE CHEZ</u> <u>RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES ET</u> <u>RHODOSPIRILLUM RUBRUM</u>	 25
I - Influence de la nature de la phase gazeuse sur les synthèses pigmentaires de Rhodopseudomonas spheroides	27

II - Recherche d'inhibiteurs chimiques de la caroténogenèse de <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	28
A - Dérivés du biphényle	29
B - Composés à deux noyaux benzéniques séparés par un groupe d'atomes	31
C - Composés hétérocycliques et polyéniques	32
III - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la caroténogenèse de <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> et de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	34
A - Influence sur la caroténogenèse de <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	34
B - Influence sur la caroténogenèse du mutant JV de <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	35
C - Influence sur la caroténogenèse de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	37

CHAPITRE III : ETUDE DE LA CONFIGURATION DES CAROTENOIDES
ACCUMULES DANS LES BACTERIES CULTIVEES EN
PRESENCE DE 2-HYDROXYBIPHENYLE

I - Configuration des isomères du phytoène	44
A - Spectres de RMN du proton des isomères du phytoène	45
1) Phytoène cis	45
2) Phytoène trans	47
B - Spectres de RMN de l'isotope 13 du carbone des isomères du phytoène	50
II - Phytofluène	55
III - ζ carotène	57
IV - Etude des caroténoïdes du mutant JV de <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	58

CHAPITRE IV : PHOTOISOMERISATION DU PHYTOENE PAR LA
9-FLUORENONE

I - Exposé des résultats obtenus "in vivo" chez <i>Rhodospirillum rubrum</i> et "in vitro" en solvant organique	61
	63

II - Etude photochimique du mécanisme d'isomérisation du phytoène .	66
A - Spectres électroniques du phytoène à basse température	67
B - Etude de l'état singulet du phytoène	69
C - Etude de l'état triplet du phytoène	72
D - Mesure de la durée de vie moyenne de l'état triplet du phytoène	75

CHAPITRE V : ETUDE DE LA CAROTENOGENESE APRES ELIMINATION
DU 2-HYDROXYBIPHENYLE ET INFLUENCE DE CET
INHIBITEUR SUR L'ACTIVITE RESPIRATOIRE 79

I - Composition en caroténoïdes des bactéries avant levée d'inhibition	81
II - Composition en caroténoïdes des bactéries après levée d'inhibition	82
III - Influence du 2-hydroxybiphényle sur l'activité de la NADH oxydase	86

CHAPITRE VI : INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA
COMPOSITION ET SUR L'EVOLUTION DU SYSTEME
MEMBRANAIRE DES BACTERIES PHOTOSYNTHETIQUES 93

I - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la biosynthèse de la bactériochlorophylle	96
II - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la synthèse des ubiquinones	98
III - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la teneur en lipides de Rhodospirillum rubrum	99
IV - Influence du 2-hydroxybiphényle sur les propriétés et la nature des pigments des chromatophores de Rhodospirillum rubrum	100
A - Préparation des chromatophores et subchromatophores	101

	Pages
B - Spectres d'absorption des chromatophores et subchromatophores	101
1) chromatophores	101
2) subchromatophores	103
C - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la composition en caroténoïdes et en bactériochlorophylle des chromatophores de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	104
V - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la composition en protéines des chromatophores de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	105
A - Traitement des chromatophores selon la méthode de BAUM	105
B - Analyse des protéines des chromatophores traités selon la technique de SEGEN et GIBSON (51)	107
VI - Influence du 2-hydroxybiphényle sur la morphologie de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	109
A - Etude morphologique des bactéries entières	110
1) Bactéries cultivées en absence d'inhibiteur	111
2) Bactéries cultivées en présence de 2-hydroxybiphényle	111
B - Etude morphologique des chromatophores issus de bactéries cultivées en absence et en présence d'inhibiteur	113
<u>CONCLUSION</u>	126
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	130

I N T R O D U C T I O N

Dès le 19^{ème} siècle, les caroténoïdes fortement colorés attirèrent la curiosité de nombreux chercheurs. De nos jours, l'extraordinaire développement des méthodes physiques a permis d'élucider la structure de plus de 300 composés différents. A côté des hydrocarbures et des xanthophylles, désormais classiques, d'autres structures récemment découvertes ont amené des modifications dans les règles de nomenclature (1). Cependant, l'appellation "caroténoïde" s'applique toujours à une classe de composés constitués de huit unités isopréniques liées de telle façon que les groupes méthyles situés à proximité du centre de la molécule soient en position I-6 et les groupes méthyles latéraux en position I-5.

Les premières étapes de la biosynthèse des stérols et des caroténoïdes se déroulent selon le même mode de condensation "tête à queue" d'unités isopréniques, suivie de la condensation "tête à tête" de deux unités de pyrophosphate de polyprényle (2). Ainsi, le squalène, précurseur des stérols, provient de la condensation "tête à tête" de deux molécules de pyrophosphate de farnésyle tandis que le phytoène, premier caroténoïde en C₄₀, provient de la condensation "tête à tête" de deux molécules de pyrophosphate de géranylgéranyle.

Comme le montre le schéma 1, les intermédiaires jusqu'en C₁₅ sont communs à l'élaboration du squalène et à celle du phytoène. Du fait que nos connaissances sur la formation du phytoène ont très largement bénéficié des résultats acquis dans la recherche du mécanisme de la biosynthèse du squalène, nous commencerons par exposer de façon détaillée la formation de ce dernier.

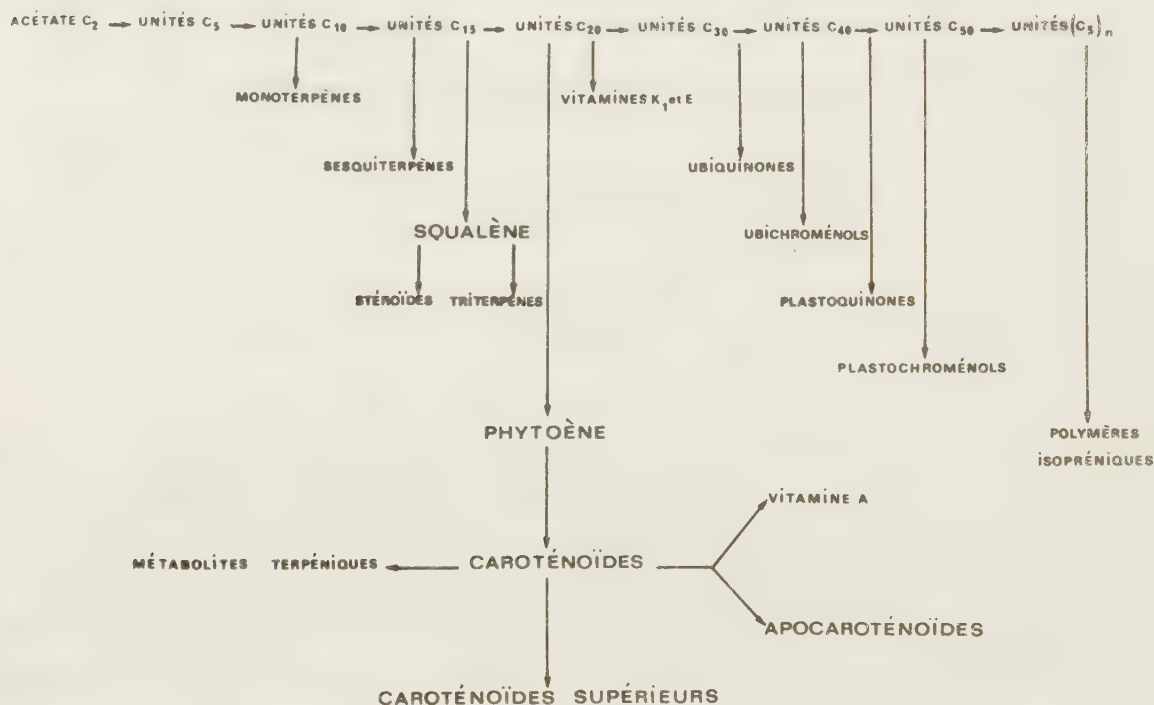
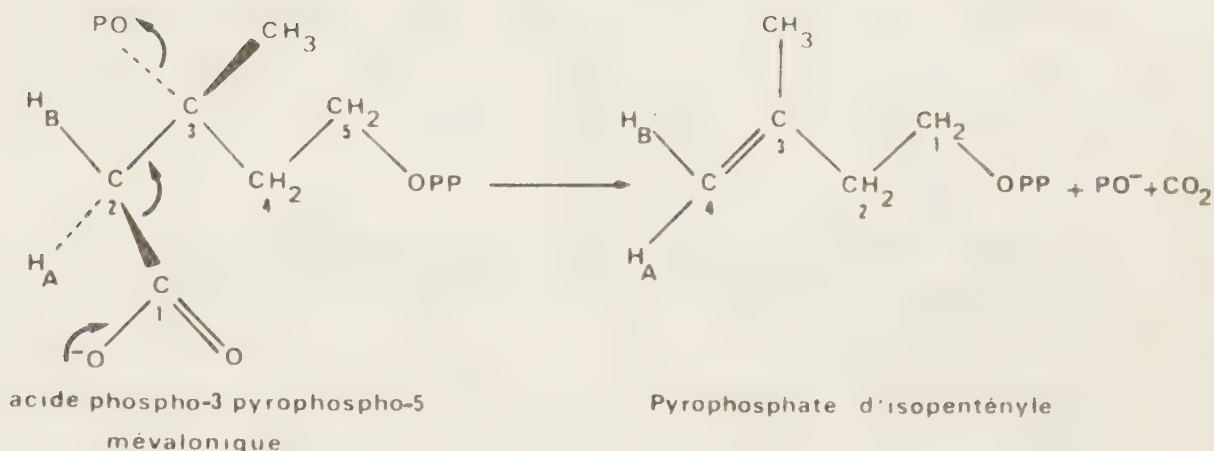


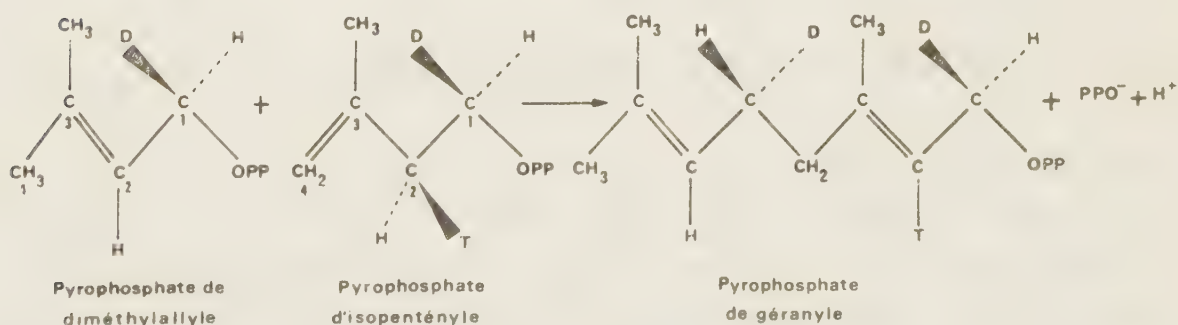
Schéma 1 : Biogenèse des composés terpéniques

Un pas décisif a été franchi après la découverte de l'acide mévalonique et de son rôle dans la synthèse des terpènes. En effet, l'utilisation de cet acide, marqué de façon stéréospécifique, a permis d'élucider la plus grande partie des problèmes de stéréochimie propres à chaque étape de la biosynthèse du squalène (3).

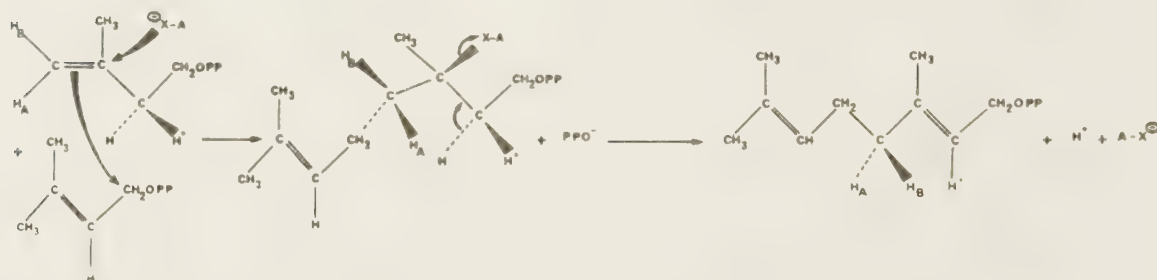
La première étape consiste en une élimination trans des groupes carboxyle et hydroxyle de l'acide phospho-3 pyrophospho-5 mévalonique et conduit à la formation de pyrophosphate d'isopentényle suivant le schéma ci-après :



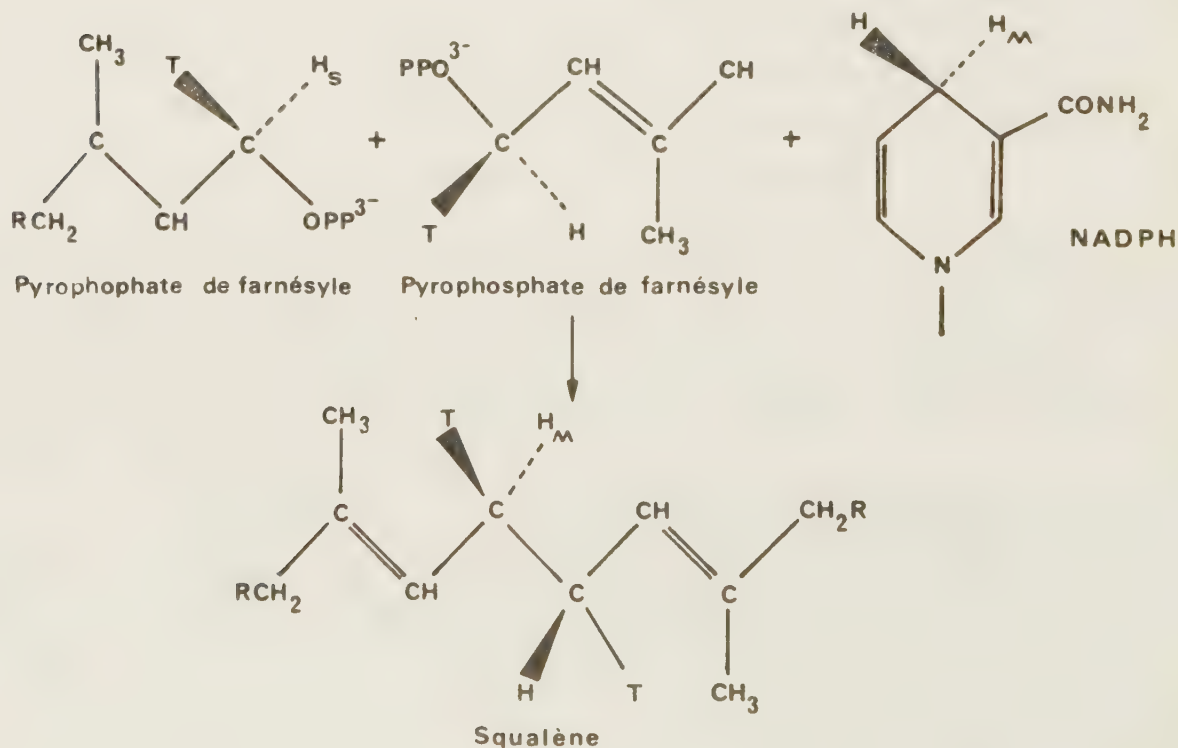
En outre, des expériences réalisées avec l'acide mévalonique, 4R (^{14}C -2, ^3H -4) et 4S (^{14}C -2, ^3H -4) (4) révèlent une inversion de configuration du C-1 du pyrophosphate de diméthyl allyle, lors de sa condensation avec le pyrophosphate d'isopentényle pour former une molécule de pyrophosphate de géranyle. Le groupe pyrophosphate du composé allylique est alors déplacé au cours d'une réaction de substitution nucléophile de type $\text{S}_{\text{N}}2$, par les électrons de la double liaison du pyrophosphate d'isopentényle. Ce dernier perd à son tour le proton 2 R, primitivement 4S dans l'acide mévalonique et l'addition des deux unités en C_5 peut être représentée par le schéma ci-dessous :



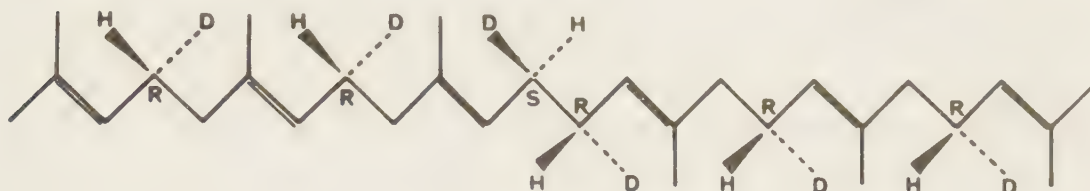
En fait, la réaction globale de formation des liaisons carbone-carbone ne peut pas être considérée comme une réaction concertée (4) et un mécanisme en deux étapes a été proposé selon le schéma ci-après :



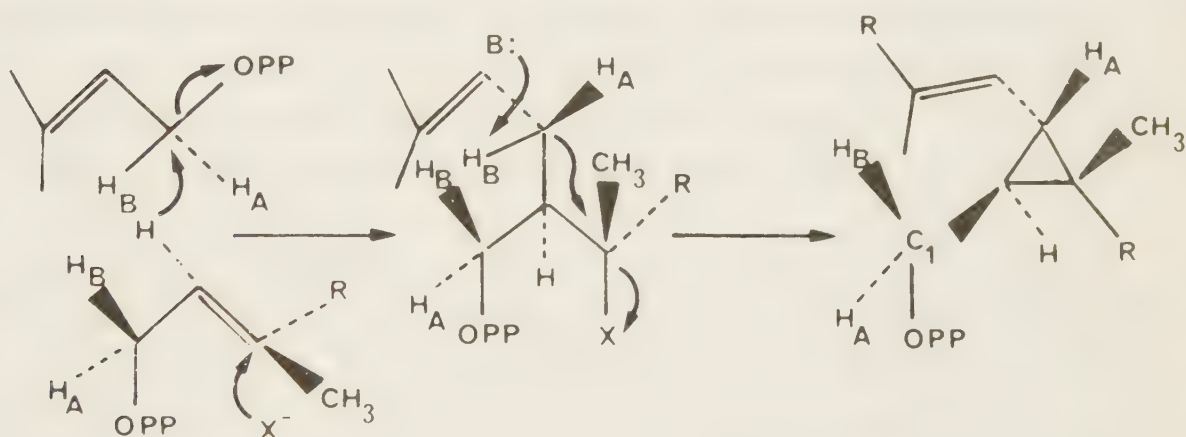
Par ailleurs, lors de la condensation de deux molécules de pyrophosphate de farnésyle pour former le squalène, le proton H_S porté par le carbone 1 de l'une des deux molécules réagissantes, est échangé avec le proton 4 pro S de NADPH (5). De plus, il y a inversion de la configuration du C-1 de la molécule de pyrophosphate de farnésyle qui n'a pas échangé de proton, comme le montre le schéma ci-dessous :



La formule ci-après représente la configuration absolue du squalène (3) synthétisé à partir d'acide mévalonique 5 R (5²H) :



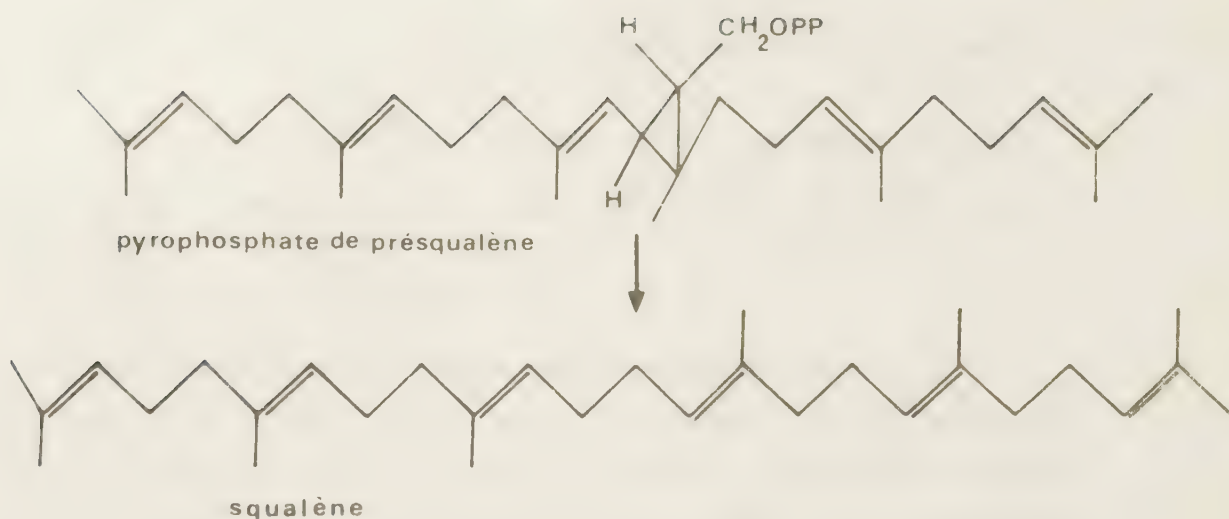
Ce mécanisme n'est cependant pas entièrement démontré et plusieurs auteurs s'accordent à reconnaître l'existence probable d'un autre intermédiaire précédant le squalène. Un pyrophosphate de pré-squalène a été récemment isolé et un nouveau mécanisme, schématisé ci-dessous, a été proposé (6) pour l'union de deux molécules de pyrophosphate de farnésyle :



pyrophosphate de présqualène



Il y aurait donc tout d'abord activation du C-2 d'une molécule de pyrophosphate de farnésyle par un groupe X donneur d'électrons, puis attaque nucléophile en C-1 d'une seconde molécule de pyrophosphate de farnésyle. L'atome de carbone C-1 perdrait son groupe pyrophosphate et subirait une inversion de configuration. La deuxième étape serait une élimination trans, en I-3, de H_B et de X pour conduire au pyrophosphate de présqualène comportant un cycle cyclopropanique. L'ouverture de ce cycle conduirait à la formation de squalène selon le schéma ci-après (7).



Il faut souligner que ce schéma, bien qu'hypothétique, vient de recevoir une nouvelle confirmation. En effet, après la synthèse du présqualène (8) un produit naturel semblable aurait été très récemment isolé chez les végétaux supérieurs (9).

Le schéma 2 représentant la biosynthèse du phytoène s'inspire largement du premier schéma développé pour la formation du squalène (10).

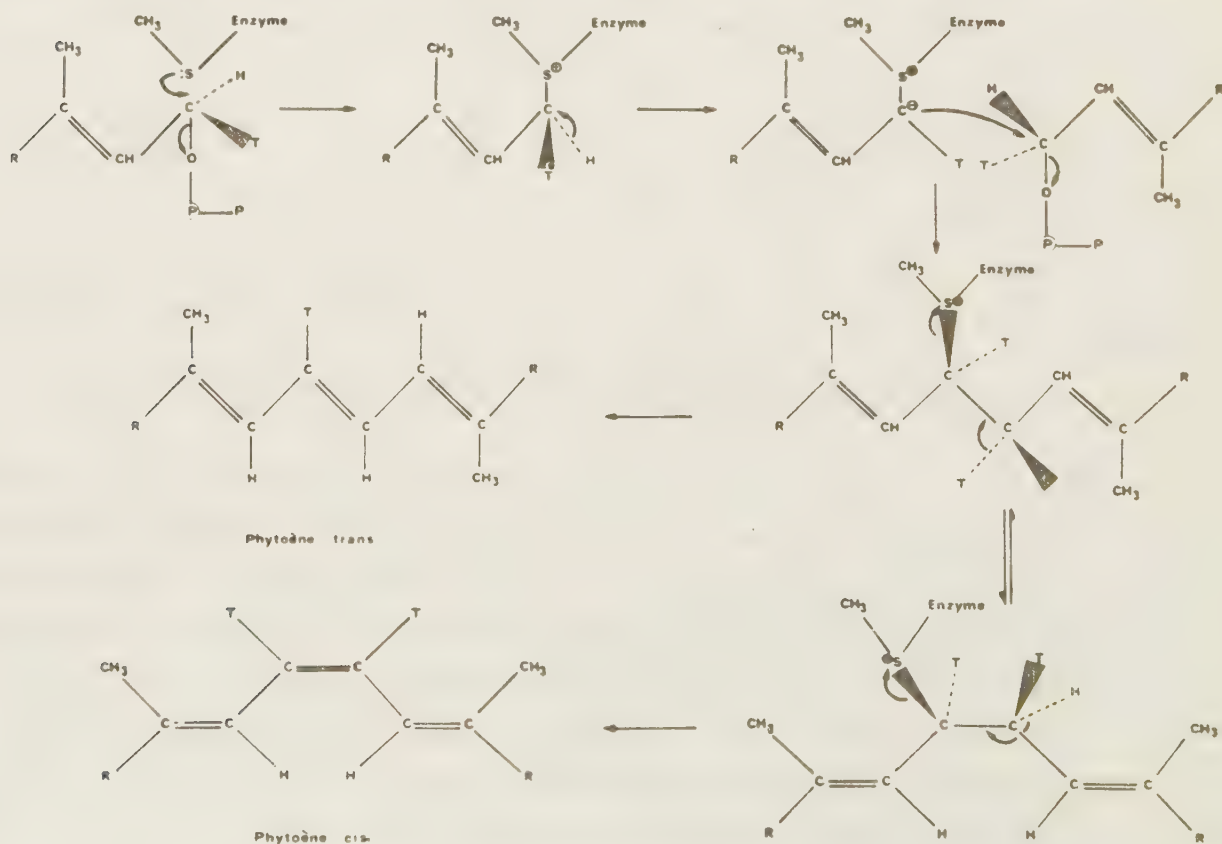
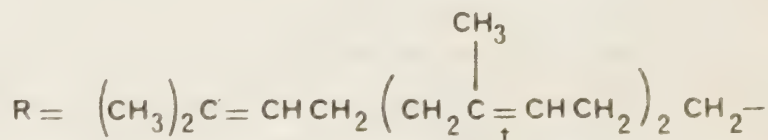
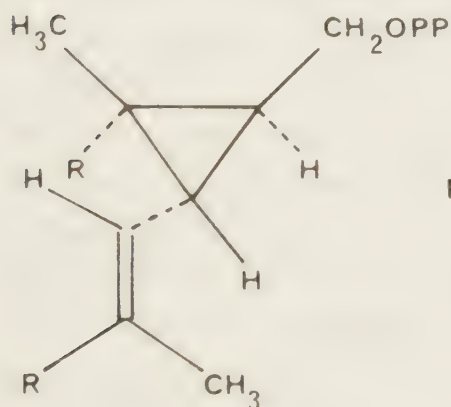


Schéma 2 : Mécanisme hypothétique proposé pour la biosynthèse du phytoène à partir du pyrophosphate de géranylgeranyle (11)

Une molécule de pyrophosphate de géranylgéranyle est fixée sur le site actif de la phytoène synthétase par un reste méthionine. Le groupe thioéther déplace le groupement pyrophosphate par substitution de type SN_2 , pour donner un ion sulfonium avec inversion de configuration de l'atome de carbone 1. Cet ion est stabilisé par la perte du proton H_5 et le composé résultant tend à s'ioniser pour former un ylide. Celui-ci s'additionne à une seconde molécule de pyrophosphate de géranylgéranyle qui subit également une inversion de configuration en C-1. Contrairement à la biosynthèse du squalène, celle du phytoène n'exige pas de NADPH, il y a élimination trans d'un proton et du reste S-Enzyme puis création d'une double liaison centrale. Le mécanisme de ces différentes étapes n'est cependant pas encore parfaitement établi et récemment l'analogue en C_{40} du pyrophosphate de présqualène aurait été isolé (12). Il a été dénommé préphytoène et répond à la formule ci-dessous :



pyrophosphate de préphytoène

La position du phytoène, en tant que premier caroténoïde en C_{40} , lui confère une importance particulière, reconnue maintenant par la plupart des auteurs. Toutefois, les mécanismes de désaturation, conduisant aux différents caroténoïdes, ne sont pas connus et pourraient ne pas être de simples déshydrogénations. En outre, si dans de très nombreux cas la double liaison centrale du phytoène est de configuration cis, l'isolement de phytoène all trans a été récemment signalé (13). Par ailleurs, le phytofluène présente principalement la configuration cis, mais la configuration all trans devient la règle générale à partir du ζ carotène.

Des changements de configuration des caroténoïdes sous l'influence de la lumière absorbée par la chlorophylle ont été signalés (14) et semblent essentiels pour un transfert efficace d'énergie et la protection des sites sensibles à l'oxydation (15). En effet, si l'importance du transfert d'énergie entre caroténoïdes et chlorophylle varie suivant les espèces (16), celles qui sont dépourvues de polyènes fortement insaturés ne sont pas viables à la lumière (17). Un des rôles des caroténoïdes serait donc de protéger les organismes photosynthétiques contre une photooxydation sensibilisée par la chlorophylle (18).

Des modifications de configuration des caroténoïdes pourraient également entraîner des changements dans la localisation des pigments et dans la structure des membranes qui les contiennent (15).

La localisation et la forme native des caroténoïdes, au sein de la cellule, posent en fait de délicats problèmes. Chez les bactéries photosynthétiques, les pigments sont localisés dans les structures communément appelées chromatophores, qui représentent des invaginations membranaires intracytoplasmiques. Par ailleurs, les caroténoïdes semblent fortement liés à des protéines dont la principale caractéristique est de posséder un taux élevé d'acides aminés hydrophobes (19). Un changement dans l'environnement protéique entraîne un déplacement du spectre d'absorption des caroténoïdes vers les grandes longueurs d'onde, mais il faut cependant souligner que le β carotène, dans les lamelles des chloroplastes, ne se trouverait dans un environnement ni purement hydrophobe, ni extrêmement polaire (20).

Les caroténoïdes ont été également l'objet de plusieurs travaux en ce qui concerne leur rôle éventuel dans les chaînes de transporteurs d'électrons (21, 22). C'est ainsi que le β carotène serait capable *in vitro*, de transférer les électrons de la ferrédoxine au NADP (23). Des études réalisées chez Rhodospseudomonas spheroides montrent toutefois qu'après illumination ou oxygénation de suspensions cellulaires, les changements d'absorption des caroténoïdes sont plus rapides que l'oxydation du cytochrome. Il faut donc en conclure que les caroténoïdes ne participeraient pas, à côté des cytochromes, aux réactions d'oxydo-réduction (21).

Chez Rhodospirillum rubrum, les caroténoïdes pourraient intervenir au niveau d'un composé riche en énergie (22), mais il s'agit là d'une hypothèse qui n'a pas encore reçu de confirmation expérimentale.

Si le rôle physiologique des caroténoïdes ne semble pas particulièrement bien élucidé, la nature et le fonctionnement des enzymes participant à l'élaboration des polyènes, y compris le phytoène, restent totalement inconnus. Certes, la formation de différents caroténoïdes a été obtenue à l'aide d'extraits acellulaires (24, 25), mais si ces expériences ont permis de préciser la nécessité de tel ou tel cofacteur, elles n'ont pas apporté de résultats convaincants en ce qui concerne la nature des enzymes et leur mécanisme dans les réactions de désaturation ou de cyclisation.

Objectifs du travail

L'étude de la caroténogénèse chez les bactéries photosynthétiques a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, les conclusions en ce qui concerne la formation et le rôle du phytoène sont loin d'être concordantes. Une des ambiguïtés provient du fait que le phytoène ne peut pas être mis en évidence dans les cultures normales de *Rps. spheroides* et de *Rh. rubrum*. En revanche, son accumulation est bien connue, d'une part sous l'influence de la diphénylamine et d'autre part chez des mutants de ces bactéries.

La diphénylamine présente toutefois l'inconvénient de diminuer sévèrement la croissance sans provoquer pour autant une accumulation de phytoène comparable à celle constatée chez les organismes non photosynthétiques. C'est pourquoi nous avons tout d'abord recherché des substances capables d'inhiber la caroténogénèse de *Rps. spheroides* et *Rh. rubrum* de façon aussi spécifique et efficace que possible. De plus, il semble important de dégager une relation entre la structure moléculaire et l'activité anti-caroténogène des composés étudiés. L'ensemble de cette étude fait l'objet du deuxième chapitre de notre travail.

Si le squalène acquiert d'emblée la configuration all trans, au moment de sa formation, le phytoène est réputé présenter la configuration cis centrale. Cependant, chez *Flavobacterium dehydrogenans*, du phytoène de configuration trans a pu être isolé. Il faut souligner que chez cette bactérie, bien que non photosynthétique, la lumière déclenche la caroténogénèse.

La détermination de la configuration du phytoène accumulé dans les cultures de *Rps. spheroides* et *Rh. rubrum* revêt donc une grande importance (ainsi que celle du phytofluène et du ζ carotène). Les résultats de nos expériences constituent le chapitre III de ce mémoire.

La sensibilité des caroténoïdes à la lumière n'est plus à démontrer, tout au moins en ce qui concerne les termes relativement insaturés. A notre connaissance, aucune étude approfondie n'a cependant été effectuée sur la photoisomérisation du phytoène. C'est pourquoi, dans le chapitre IV, nous avons étudié les états métastables des isomères du phytoène à l'aide des spectres de fluorescence et de phosphorescence.

Le rôle du phytoène comme précurseur des caroténoïdes a souvent été abordé par une méthode cinétique avec des résultats parfois contradictoires.

Cette méthode consiste à suivre simultanément la diminution de la quantité de phytoène préalablement accumulé et l'accroissement du taux de chacun des caroténoïdes nouvellement formés.

Cependant, aucune étude particulière n'a été entreprise jusqu'ici en ce qui concerne le pourcentage de transformation des isomères des précurseurs des caroténoïdes.

Dans le chapitre V, nous exposons les résultats obtenus lors de l'évolution des caroténoïdes de *Rps. spheroides* et *Rh. rubrum* après levée d'inhibition.

Quelques travaux relatifs à l'influence de la diphénylamine sur la synthèse de la bactériochlorophylle et des ubiquinones chez les bactéries photosynthétiques ont déjà été publiés. Il ne semble pas toutefois qu'une étude de l'influence de l'inhibiteur sur la morphologie soit des bactéries entières, soit de leurs chromatophores ait déjà été entreprise. Il est cependant extrêmement important de connaître dans quelle mesure l'introduction d'une substance capable de bloquer la caroténogénèse, influence le développement de l'appareil photosynthétique ; ceci fait l'objet du sixième et dernier chapitre de ce mémoire.

CHAPITRE I

MATERIELS ET TECHNIQUES

I - MATERIELS

A - Microorganismes

Nous avons utilisé deux bactéries photosynthétiques appartenant à la famille des Athiorhodacées : Rhodopseudomonas spheroides (souche NCIB N° 8253) et Rhodospirillum rubrum (souche ATCC N° 111).

Nous avons également obtenu un mutant spontané de couleur jaune vert, après étalements répétés de la souche sauvage Rps. spheroides, sur boîtes de Pétri. Ce mutant photosynthétique stable, appelé souche JV, nous a permis d'étendre notre étude sur l'inhibition de la caroténogénèse.

B - Solvants

L'éther de pétrole (EP - fraction distillant entre 40°C et 60°C) est filtré sur colonne de gel de silice Merck 0,2-0,8 mm contenant 20 % de nitrate d'argent afin d'écarter les composés insaturés et autres impuretés fluorescentes. L'élimination des hydrocarbures benzéniques s'effectue par sulfonation du solvant puis distillation entre 40°C et 60°C.

L'acétone est débarrassée des impuretés fluorescentes par distillation. L'éther sulfurique (ES) est séché sur sodium puis distillé avant utilisation. Les autres solvants sont des produits purs pour analyse.

C - Adsorbants chromatographiques

Pour séparer les isomères cis et trans du phytoène, l'alumine basique Woelm (activité I) nous a donné les meilleurs résultats (26).

Le mélange magnésie-hyflosupercel I/I s'est révélé satisfaisant pour séparer les isomères du phytofluène et du ζ carotène alors que l'alumine Merck, d'activité II/III, nous a fourni de bonnes séparations des caroténoïdes plus insaturés.

L'alumine acide Woelm (activité III) a été utilisée pour l'isolement des ubiquinones et l'acide silicique (Mallinckrodt 100 mesh) a permis de séparer les différentes classes de lipides.

Enfin, pour la chromatographie sur couche mince, nous avons utilisé le gel de silice G. (Merck).

II - TECHNIQUES

A - Cultures des bactéries

Les cultures de faible volume ont été réalisées en boîtes de Roux ou en fioles de Fernbach d'un litre, tandis que les cultures de plus grande capacité, ont été effectuées dans un incubateur Biolafitte de vingt litres. Dans tous les cas, la température a été maintenue constante à 30°C. Pour les cultures photosynthétiques, l'éclairement continu (8 000 lux environ) a été obtenu à l'aide de lampes à incandescence Philips "Attralux spot" de 150 W, l'anaérobiose étant assurée, selon l'expérience, par le mélange N_2-CO_2 (95 % - 5 %), par l'azote ou par l'hydrogène dont la pureté est supérieure à 99,5 %. Dans le cas des cultures effectuées à l'obscurité, l'aérobiose a été maintenue par injection d'air ou d'oxygène à 99,5 %.

Pour les souches de Rps. spheroides, le milieu de culture employé est voisin du milieu S de Lascelles (27) et présente pour un litre, la composition suivante : extrait de levure Difco 3 g ; glutamate de sodium 3 g ; $MgSO_4$, 7 H_2O 0,5 g ; KH_2PO_4 0,5 g ; K_2HPO_4 0,5 g ; $FeSO_4$ 0,01 g ; H_2O q.s.p. 1 litre. Le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de soude N. Le milieu solide comporte en plus 20 g de gélose.

Pour Rh. rubrum, le milieu de culture utilisé est une variante de celui de ORMEROD (28), et contient également, pour un litre : acide DL malique 6 g ; glutamate de sodium 2 g ; extrait de levure Difco 0,6 g ; KH_2PO_4 0,6 g ; K_2HPO_4 0,9 g ; $MgSO_4$, 7 H_2O 0,2 g ; $CaCl_2$ 0,05 g ; H_2O q.s.p. 1 litre. Le pH est amené à la neutralité à l'aide d'une solution de soude 6 N.

B - Incubation des bactéries non proliférantes

Afin d'étudier la caroténogénèse en absence de croissance bactérienne, nous avons placé les cellules préalablement lavées, en tampon phosphate de potassium 10^{-2} M, pH 7,5.

C - Inhibition et levée d'inhibition de la caroténogénèse

Les différentes substances chimiques utilisées comme inhibiteurs, sont des produits purs pour analyse. Elles ont été incorporées au milieu de culture, avant son ensemencement, dans un très faible volume d'alcool éthylique ou d'acétone, en fonction de leur solubilité.

Les expériences de levée d'inhibition impliquent l'élimination de l'inhibiteur par des lavages répétés des bactéries à l'aide d'une solution tampon phosphate de potassium 10^{-2} M, pH 7,5. Dans le cas du 2-hydroxybiphényle, plus particulièrement étudié, sa disparition a été contrôlée par une réaction colorée des phénols (29). Après disparition de l'inhibiteur, la suspension cellulaire a été agitée soit sous courant d'azote à la lumière, soit en présence d'air à l'obscurité.

D - Extraction et séparation des caroténoïdes

L'ensemble de ces manipulations doit s'effectuer à température aussi basse que possible et en absence de lumière afin d'éviter tout risque d'isomérisation. Les bactéries, récoltées par centrifugation à 4°C, ont été traitées trois fois à l'aide du mélange acétone-méthanol 7/2 (30). Après épuisement, les pigments repris à l'éther de pétrole ont été saponifiés à froid pendant 12 heures, par une solution de potasse alcoolique à 10 %. Après élimination de la potasse et neutralisation, l'insaponifiable, qui renferme les caroténoïdes, a été chromatographié sur colonne d'alumine.

Plusieurs chromatographies sur colonne ont été nécessaires pour obtenir les différents caroténoïdes à l'état pur. Afin d'éviter une élévation de température, les colonnes utilisées sont réfrigérées par circulation d'eau pendant toute la durée de la séparation chromatographique.

Sur alumine Woelm basique d'activité I, le phytoène cis s'élue avec 3 % d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole tandis qu'un autre isomère du phytoène ne s'élue qu'avec 5 % d'ES dans EP. A partir de 15 % d'ES, on recueille un premier isomère du phytofluène tandis qu'un second isomère ne s'élue qu'avec 40 % d'ES. Le ζ carotène fortement adsorbé, ne migre qu'à partir de 60 % d'ES. Les autres caroténoïdes sont élués d'abord avec ES seul, puis avec 5 % de méthanol dans ES.

La fraction ζ carotène est purifiée à nouveau sur colonne de magnésie-hyflosupercel I/I, ce qui permet de séparer un premier isomère s'éluant à l'EP tandis qu'un second isomère nécessite 10 % ES dans EP.

Sur alumine Merck basique II/III, le neurosporène s'élue avec 5 % ES dans EP. Un dérivé hydroxylé du neurosporène, plus polaire, ne s'obtient qu'avec 10 % ES dans EP. Les autres caroténoïdes, plus insaturés, du type sphéroïdénone, nécessitent un pourcentage encore plus élevé d'ES, tandis que la spirilloxanthine ne s'élue qu'avec 2 % de méthanol dans l'éther sulfurique.

E - Dosage des caroténoïdes

Les pigments en solution dans EP sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DK 2S. La formule ci-dessous donne la quantité de caroténoïde en µg par gramme de bactéries sèches :

$$Q = \frac{D \times 10 \times V \times 1000}{E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} \times P}$$

D = densité optique mesurée pour le pic d'absorption maximum

V = volume en ml de la solution de pigment

P = poids en grammes de bactéries sèches

$E_{1 \text{ cm}}^{1 \%}$ = coefficient d'extinction à la longueur d'onde du maximum d'absorption, dans l'éther de pétrole (voir tableau 1).

F - Détermination des ubiquinones

Nous avons utilisé la technique de THRELFALL (39) à partir de cellules entières. Les bactéries sont extraites deux fois à l'éthanol bouillant et trois fois à l'aide du mélange alcool-éther sulfurique 1/3 (v/v). Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation et le surnageant est repris à l'éther sulfurique. Après élimination complète de l'alcool, la solution étherée est traitée par Na_2SO_4 , la séparation chromatographique est effectuée sur colonne d'alumine acide Woelm (activité III), à l'aide de quantités croissantes d'ES dans EP. Les ubiquinones s'éluent avec 7 % d'ES et se séparent nettement des caroténoïdes. Elles sont mises en solution dans l'éthanol absolu et on enregistre le spectre ultraviolet. La forme quinone est transformée en quinol par addition de cristaux de NaBH_4 dans la cellule du spectrophotomètre. Après 30 secondes, on enregistre le spectre de la forme réduite. La quantité de quinone présente est calculée en mesurant la diminution d'absorption à 275 nm,

longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la forme quinone.
Dans ces conditions :

$$\Delta E_{1 \text{ cm}}^{1 \%} = 142 \text{ d'après LAWSON (40).}$$

TABLEAU 1

Caractéristiques spectroscopiques des caroténoïdes
en solution dans l'éther de pétrole

CAROTENOIDES	Valeurs en nm des maxima d'absorption	$E_{1 \text{ cm}}^{1 \%}$	Références
Phytoène cis	275 - <u>285</u> - 296	850	31
Phytofluène	332 - <u>348</u> - 368	1540	32
ζ carotène	378 - <u>399</u> - 424	2500	33
Neurosporène	415 - <u>439</u> - 469	2900	34
Sphéroïdène	426 - <u>451</u> - 481	2600	35
Sphéroïdénone	451 - <u>481</u> - 512	2100	35
Lycopène	446 - <u>474</u> - 506	3450	36
Rhodopine	446 - <u>473</u> - 503	3100	37
Rhodovibrine	455 - <u>483</u> - 516	2700	37
Spirilloxanthine	462 - <u>494</u> - 528	2350	38

G - Détermination des lipides totaux et des phospholipides

Nous avons utilisé la technique de PARK (41), légèrement modifiée. Les bactéries, récoltées par centrifugation, sont lavées avec une solution aqueuse contenant 0,85 % de chlorure de sodium. Elles sont ensuite traitées successivement à l'acétone, puis 3 fois à l'aide du mélange chloroforme-méthanol 2/1 (v/v) et 2 fois avec le mélange chloroforme-méthanol 1/1 (v/v). Chacune de ces extractions dure environ deux heures. Tous les extraits sont alors rassemblés et concentrés à sec. Ils sont repris ensuite par le mélange chloroforme-méthanol 2/1 et lavés à l'eau afin d'éliminer les contaminants non lipidiques. La phase inférieure est amenée à sec et le poids obtenu représente la quantité lipidique totale.

Par chromatographie sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt (100 mesh) les lipides neutres s'éluent au chloroforme tandis que les lipides polaires nécessitent un gradient de méthanol dans le chloroforme, successivement 1/2, 1/1 et 4/1 (v/v). Par ailleurs, le contenu en phosphore a été déterminé suivant la technique colorimétrique de BARTLET (42).

Les phospholipides sont séparés par chromatographie monodimensionnelle sur couche mince de gel de silice avec comme éluant le mélange suivant : chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (250-74-19-3 v/v) (41). Le réactif au phosphomolybdate d'ammonium fait apparaître, les phospholipides en bleu sur fond blanc, après pulvérisation et chauffage prolongé à 105°C. Nous avons pu ainsi caractériser, en fonction des Rf croissants, la phosphatidylcholine, le phosphatidylglycérol et la phosphatidyl-éthanolamine.

H - Technique spectroscopiques

Les spectres de masse des différents caroténoïdes isolés, ont été tracés sur un spectromètre Thomson Houston THN 208 à introduction directe, la température de la source étant de 220°C et la tension d'accélération de 70 eV.

Les spectres infrarouges ont été réalisés à l'aide d'un appareil Perkin Elmer 337, les échantillons étant dissous, en fonction du domaine étudié, dans le sulfure de carbone ou dans le tétrachlorure de carbone pour spectroscopie.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été obtenus à l'aide des appareils Varian 60 MHz, Brucker HFX 90 MHz et Thomson Houston 250 MHz avec balayage de champ.

Les spectres RMN du carbone 13 ont été effectués à l'aide de l'appareil Brucker 22,63 Hz avec transformation de Fourier et accumulation.

Chaque produit, à raison de 15 à 20 mg, a été dissous dans du chloroforme deutérié et le tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne.

Dans tous les cas, nous avons évité particulièrement tout risque d'échauffement du produit pouvant conduire à une isomérisation thermique.

I - Déterminations des états métastables du phytoène

Les spectres à basse température (-196°C) ont été tracés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 15, équipé d'une cellule en quartz Suprasil de 0,075 mm d'épaisseur à circulation d'azote liquide. Les caroténoïdes sont dissous dans du méthylcyclohexane pur pour spectroscopie. Les états excités transitoires des isomères du phytoène ont été étudiés dans le même solvant, à l'aide d'un spectrofluorimètre Jobin-Yvon, type Bearn, muni d'une lampe à xénon et d'un phosphoroscope. Les durées de vie des états triplets sont mesurées à l'aide d'un oscilloscope Tektronix 564 à écran rémanent. La trace obtenue à l'oscilloscope est photographiée à l'aide d'une caméra Polaroid. Les spectres de fluorescence et de phosphorescence ont tous été effectués à -196°C .

J - Microscopie électronique

Les bactéries entières et les chromatophores ont été examinés au microscope électronique Siemens Elmiskop 101. La tension accélératrice utilisée est de 80 kV. Les bactéries ont été traitées selon la technique de RYTER et KELLENBERGER (43) : la préfixation des bactéries est obtenue en ajoutant 1 ml de fixateur contenant 1 % d'acide osmique à 10 ml de culture. On centrifuge immédiatement pendant 5 minutes à 5 000 g. Le culot est alors remis en suspension dans environ 0,1 ml de Bactotryptone à 1 % et 1 ml de fixateur puis laissé une nuit pour la fixation principale. Après centrifugation, le culot est repris dans environ 0,5 ml de gélose à 2 %. Après durcissement, le bloc de gélose est traité par une solution à 0,5 % d'acétate d'uranyle puis deshydraté dans une série de bains de concentration croissante en alcool (25, 50, 75, 90 %). L'inclusion des bactéries est alors réalisée dans de l'EPON 812. Les coupes, obtenues à l'aide d'un ultra microtome Reichert, sont contrastées au citrate de plomb (44).

Les chromatophores ont été fixés à l'aide d'une solution à 2 % d'aldéhyde glutarique et les colorations négatives effectuées selon la technique de HUXLEY (45) avec une solution d'acide phosphotungstique à 2 %.

2 - Isolement et purification des chromatophores

Pour l'obtention et la purification des chromatophores, nous nous sommes inspirés des travaux de FRAKER (19) et de VERNON (46). Toutes les manipulations ont été effectuées à 5°C et à l'abri de la lumière. 100 g de cellules fraîchement récoltées (poids humide) sont mises en suspension dans 100 ml de tampon Tris-Hcl (Trihydroxyéthylaminométhane) 0,1 M contenant 0,01 M d'EDTA (éthylènediaminetétracétate), pH 7,6. Les bactéries sont ensuite broyées soit à l'aide de la presse de French à la pression de 10^2 kg/cm^2 , soit avec un broyeur MSK (Braun, Melsungen) utilisant des billes de verre de 0,17 mm de diamètre. Cette opération s'effectue pendant cinq minutes à une température voisine de 5°C, grâce à une circulation continue de neige carbonique autour de la fiole de broyage. Après élimination des billes de verre, le broyat est centrifugé deux fois 30 minutes à 23 000 g (les valeurs de g sont toujours données pour le rayon maximum). Le surnageant est centrifugé pendant 90 minutes à 176 000 g (centrifugeuse Beckman Spinco L 50, rotor 50,1). Le culot ainsi obtenu représente la fraction "chromatophores bruts". Après homogénéisation, celle-ci est purifiée sur colonne de Sépharose 2B (30 x 5 cm) et éluée avec le même tampon que ci-dessus (19). Les fractions fortement pigmentées contenant les chromatophores sont rassemblées et concentrées par centrifugation à 176 000 g pendant 90 minutes. Le culot, remis en suspension dans le volume minimum de solution tampon, est déposé sur un gradient linéaire de saccharose (20 à 40 %) puis centrifugé cinq heures à 100 000 g (rotor SW. 50,1). La fraction "chromatophores purs" forme un anneau coloré dans le tiers inférieur du tube. Nous avons également utilisé des gradients de FICOLL (6 à 16 % poids/poids). Il est à noter, dans ces conditions, que la distribution des fractions membranaires est dans un ordre inverse de celui obtenu avec un gradient de saccharose.

3 - Fractionnement et extraction des chromatophores

Les chromatophores préalablement purifiés ont été traités pendant 3 heures à + 5°C à l'aide de la solution tampon contenant 10 % de Triton X-100 (v/v). Après centrifugation à 176 000 g pendant 3 heures (rotor 50,1), le culot est remis en suspension et centrifugé 15 heures à

110 000 g, en gradient de saccharose 20-40 % (rotor SW 50,1). A ce stade on observe, au sommet du tube, trois zones très nettement séparées représentant différentes unités subchromatophores.

Pour la détermination du contenu en bactériochlorophylle des chromatophores, nous avons utilisé les coefficients d'extinction donnés par CLAYTON (47). Les protéines ont été dosées selon la méthode colorimétrique de LOWRY (48).

Le contenu protéique des chromatophores a été également examiné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en utilisant le dispositif SHANDON. Les quantités de protéines déposées sur chaque tube de 60 mm, sont voisines de 100 µg. Pour cette étude, nous avons utilisé la technique de TAKAYAMA (49), modifiée par BAUM (50) ainsi que celle de SEGEN (51). Dans le premier procédé, les membranes sont dissoutes dans le mélange phénol-urée-acide acétique-eau, 2-1,2 (P/P) 1-1 (v/v), dans le second les chromatophores sont portés dix minutes à 100°C en présence de 1 % de lauryl sulfonate de sodium et de 1 % de β mercaptoéthanol. Après migration électrophorétique des protéines, les gels sont fixés et colorés par une solution contenant 0,5 % d'amidoschwartz 10 B (Merck, Darmstadt) dans l'acide acétique à 7,5 %. Après élimination de l'excès de colorant par de l'acide acétique à 7,5 %, l'intensité de coloration des différentes bandes protéiques a été mesurée à 546 nm et enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre Eppendorf 1101, muni d'un enregistreur Philips 4410.

M - Détermination de l'activité NADH oxydase (52)

Après deux passages des bactéries à la presse de French à la pression de 10^3 kg/cm², le broyat est centrifugé à 19 000 g. Le surnageant, contenant les membranes, est centrifugé 2 fois pendant une heure à 220 000 g (Spinco rotor 65). Le culot obtenu représente la fraction "membranes brutes". L'essai enzymatique s'effectue à 25°C dans les cuves en quartz de 1 cm de trajet optique. Le mélange réactionnel contient 2,5 ml de tampon phosphate de potassium 0,05 M - pH 7,6 et 100 à 500 µg de protéines pour un volume final de 3 ml. La réaction est induite par l'addition de 0,1 nM de NADH (C.F. BOEHRINGER, MANNHEIM) et la diminution

de densité optique est suivie à 334 nm (filtre optique), trente secondes après l'addition de NADH et pendant des durées variables. Le spectrophotomètre utilisé est muni du dispositif de support de cuves thermostatées.

Il est à noter que le tampon phosphate est toujours utilisé dans ces expériences, car le tampon Tris-HCl contenant de l'EDTA inhibe aussi bien l'activité photophosphorylante que l'activité NADH oxydase.

CHAPITRE II

INHIBITION DE LA CAROTENOGENESE

CHEZ RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES ET RHODOSPIRILLUM RUBRUM

La biosynthèse des pigments photosynthétiques a souvent été abordée à l'aide de mutants, cependant l'utilisation de diverses substances chimiques a également permis de mettre en évidence des précurseurs ou des intermédiaires de la chaîne biosynthétique des caroténoïdes.

I - INFLUENCE DE LA NATURE DE LA PHASE GAZEUSE SUR LES SYNTHÈSES PIGMENTAIRES DE RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES

La pigmentation de cette bactérie dépendant étroitement de la tension en oxygène à l'obscurité, et de l'intensité lumineuse en anaérobiose (30), un moyen commode d'inhiber la synthèse pigmentaire était donc de cultiver Rps. spheroides, en boîtes de Roux, en présence d'oxygène pur et sous éclairage intense. En effet, dans de telles conditions, les cellules de l'inoculum initialement brunes en raison du contenu élevé en sphéroïdène, caroténoïde abondant en anaérobiose, deviennent rapidement blanches du fait de la répression de la synthèse des chlorophylles et de celle des caroténoïdes colorés. En répétant de telles cultures, les cellules sont totalement dépourvues de pigments photosynthétiques mais le phytoène et le phytofluène n'ont jamais pu y être mis en évidence.

Le remplacement de l'oxygène par de l'azote, tout en maintenant l'illumination, n'amène aucune pigmentation même après plusieurs jours. Celle-ci ne reprend que lorsque les cellules sont placées dans un milieu neuf qui permet la reprise de la division cellulaire.

Si la maturité d'un fruit se traduit, en partie, par la régression progressive de la couleur verte due aux chlorophylles et l'apparition de couleurs vives souvent dues à des caroténoïdes formés au moment de la phase climatérique, le rôle de l'éthylène dans ces phénomènes n'a pas reçu d'explication satisfaisante sur le plan biochimique (53). Cependant il nous a semblé intéressant d'utiliser cet hydrocarbure à l'état pur pour assurer l'anaérobiose. Nous pouvions en effet espérer obtenir de cette façon une diminution de la teneur en chlorophylle en même temps qu'une modification de la composition en caroténoïdes. En fait, la présence d'éthylène, dans les cultures de bactéries photosynthétiques, ne semble modifier de façon sensible ni la croissance ni la caroténogénèse de Rps. spheroides.

II - RECHERCHE D'INHIBITEURS CHIMIQUES DE LA CAROTENOGENESE DE RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES (SOUCHE SAUVAGE)

Si, dès 1936 KHARASCH (54) a observé l'influence de la DPA sur la chromogénèse de plusieurs bactéries et champignons, TURIAN (55) a été le premier à étudier l'action de ce composé sur la formation des caroténoïdes.

Depuis, la recherche de nouveaux anticaroténogènes a été poursuivie et l'influence de certains inhibiteurs tels que le cyanure de potassium, l'hydrazine, l'hydroxylamine, le fluorure de sodium, l'azoture de sodium et le 2,3-dinitrophénol, dont l'action est connue dans d'autres métabolismes, a été aussi étudiée sur la pigmentation bactérienne (56). Ces composés inhibent, en général, presque totalement la croissance même à des concentrations très faibles et n'ont donc pas été retenus.

L'action anticaroténogène de différents composés hétéro-cycliques a été également signalée chez Mycobacterium (57) mais c'est surtout les dérivés du biphényle, et plus spécialement ceux substitués de façon asymétrique, qui paraissent les plus actifs chez les levures du genre Rhodotorula (58).

Avant d'aborder la description des résultats que nous avons obtenus chez Rps. spheroides, il convient de mentionner la composition en caroténoïdes des cellules normales.

En anaérobiose à la lumière, les cultures de Rps. spheroides présentent une couleur brune due principalement au sphéroïdène, tandis qu'en aérobiose à l'obscurité, ces mêmes cultures ont une couleur pourpre due à la sphéroïdénone.

Le tableau 2 reproduit la composition en caroténoïdes de Rps. spheroides (souche sauvage) en fonction des conditions de culture, et ces résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus par d'autres auteurs (35).

TABLEAU 2

Composition en caroténoïdes de Rhodopseudomonas spheroides
après une croissance de 48 heures en anaérobiose
à la lumière (A) ou en aérobiose à l'obscurité (B)

Caroténoïdes *	A	B
ζ carotène	0,4	—
Neurosporène	3,6	0,2
Sphéroïdène	85,0	28,6
Sphéroïdénone	11,0	71,2

* Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la totalité des caroténoïdes.

Les essais d'inhibition ont été réalisés à 30°C, sous éclair-
ement constant et en boîtes de Roux de 1 litre munies de tubulures pour
le barbotage de la phase gazeuse (N₂ - CO₂ 95/5).

Les cultures dont la caroténogénèse est réprimée, possèdent
une couleur pouvant aller du jaune crème au brun vert. En effet, le
sphéroïdène et la sphéroïdénone, qui masquent normalement la couleur
verte, existent alors en faible quantité, tandis que les pigments plus
saturés s'accumulent et laissent apparaître la couleur verte due à la
bactéριοchlorophylle.

Nous avons classé ci-après les substances chimiques utilisées,
en différents groupes suivant les analogies structurales.

A - Dérivés du biphényle

Le tableau 3 rassemble les résultats obtenus avec certains
dérivés du biphényle qui diffèrent par la nature, le nombre et la position
des substituants.

Ces substituants sont classés par ordre d'électronégativité croissante : -OH, -NH₂, -OCH₃, -F, -Br, -NO₂, -COCH₃, -COOH.

Les dérivés possédant les groupements fonctionnels -OH et NO₂, de polarité opposée, modifient tous deux la synthèse pigmentaire. En conséquence, l'effet induit, donneur ou accepteur, causé par le substituant, ne doit pas être essentiel à l'activité anticaroténogène.

TABLEAU 3

Influence de certains dérivés du biphényle
sur la pigmentation de Rhodopseudomonas spheroides
en anaérobiose à la lumière

Nature du substituant	Position						deca
	2	4	2 - 2'	3 - 3'	4 - 4'	2 - 2' 4 - 4'	
- OH	+	+	+		++	++	
- NH ₂	++	++					
- OCH ₃				++			
- F	++		++		++		++
- Br					++		
- NO ₂	+	+			++		
- COCH ₃		++					
- COOH		++	++				

- Pigmentation nulle
- + Pigmentation faible
- + Pigmentation moyenne
- ++ Pigmentation normale

Ces résultats obtenus chez *Rps. spheroides* sont différents de ceux rencontrés chez *Mucor hiemalis* (59). En effet, chez ce champignon, les dérivés méthylés, méthoxylés et acétylés du biphenyle inhibent fortement la caroténogenèse et chez les levures du genre *Rhodotorula*, le 4-acétylbiphenyle entraîne l'inhibition la plus importante (60).

Il est à noter, chez *Rps. spheroides*, que l'activité du 2,2'-dihydroxybiphenyle dépend également de la composition de la phase gazeuse qui assure l'anaérobiose. En effet, l'inhibition de la croissance bactérienne causée par le 2,2'-dihydroxybiphenyle est encore accrue soit par la présence d'anhydride carbonique soit par celle d'oxygène. Au contraire, lorsque l'anaérobiose est réalisée par de l'azote, de l'argon ou de l'hydrogène, la croissance et la pigmentation bactériennes retrouvent leur aspect normal, pour les mêmes concentrations en inhibiteur que celles utilisées auparavant.

Par ailleurs, le 4-hydroxybiphenyle possède une propriété bactéricide qui le rend inutilisable en ce qui concerne l'inhibition de la caroténogenèse.

De même, les dérivés nitrés du biphenyle, en position ortho ou para affectent également la croissance bactérienne et le 2-nitrobiphenyle semble de plus altérer la synthèse chlorophyllienne. Comme dans le cas du 2,2'-dihydroxybiphenyle, la présence d'anhydride carbonique renforce l'activité bactéricide de ce dérivé nitré du biphenyle.

B - Composés à deux noyaux benzéniques séparés par un groupe d'atomes.

Parmi ces substances, la DPA est incontestablement celle qui a été la plus utilisée. Chez *Rps. spheroides*, nous avons obtenu pour 60 μM de DPA, les quantités suivantes de caroténoïdes, exprimées en μg par gramme de bactéries sèches : phytoène 80, phytofluène 300, ζ carotène 200, neurosporène 100, sphéroïdène 2550 et sphéroïdénone 500. La teneur en caroténoïdes colorés est très importante et il devient donc difficile de parler, dans ce cas, d'inhibition de la caroténogenèse. A des concentrations plus élevées en DPA, les précurseurs sont relativement plus abondants, mais la croissance bactérienne est considérablement diminuée. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par d'autres auteurs pour des doses analogues de DPA (57).

D'après le tableau 4, nous voyons que les dérivés hydroxylés de la DPA inhibent la croissance et la pigmentation de Rps. spheroides encore plus fortement que ne le fait la DPA.

TABLEAU 4

Influence de certains dérivés de la diphénylamine sur la pigmentation de Rhodopseudomonas spheroides en anaérobiose à la lumière

Nature du substituant	Position		
	2	3	4
OH		-	-
NH ₂	+		+
COOH	+		
NH · C ₆ H ₅			+

- Pigmentation nulle

+ Pigmentation moyenne

En revanche, l'acide 2-phénoxybenzoïque n'a aucune action sur la pigmentation et les cultures présentent leur aspect habituel.

De même, des dérivés à encombrement spatial plus important, n'affectent ni l'intensité de la pigmentation, ni la croissance des bactéries. Nous citerons le 1,1-diphényléthanol, le 2,2-bis (hydroxy-4 phényl)-propane et le diéthylstilboestrol.

Il n'en est pas de même pour la benzophénone et pour la 9-fluorénone qui diminuent la pigmentation en même temps que la croissance de Rps. spheroides.

C - Composés hétérocycliques et polyéniques

L'inhibition de la formation de certains caroténoïdes par la pyridine et ses dérivés (61) nous a incités à étudier l'influence de différents composés hétérocycliques azotés sur la caroténogenèse de Rps. spheroides.

Nous avons retenu plus particulièrement ceux qui, par ailleurs, présentent déjà une activité biologique connue, comme par exemple les herbicides (62).

Le 2,2'-bipyridyle altère fortement la croissance sans pour cela modifier la pigmentation de façon significative.

Le Diquat (dibromure 1,1'-éthylène 2,2'-bipyridylium) et Paraquat (dichlorure de 1,1'-diméthyl 4,4'-bipyridylium) conduisent à des cultures parfaitement normales.

Par ailleurs nous avons tenté d'inhiber la caroténogénèse de Rps. spheroides par l'amphotéricine B. Nous pouvions en effet espérer que cet antifongique possédant 7 doubles liaisons conjuguées pouvait entrer en compétition avec les enzymes intervenant dans la désaturation du ζ carotène. En fait nous avons constaté que l'amphotéricine B n'inhibe pas la croissance bactérienne et n'entraîne aucune modification de la pigmentation des bactéries.

Malgré de nombreux essais, nous n'avons pu retenir que le 2-hydroxybiphényle comme inhibiteur efficace de la pigmentation de Rps. spheroides (63). Ceci semble indiquer qu'une certaine structure est requise pour obtenir une action efficace.

Les dérivés du biphényle ont déjà fait l'objet de nombreux travaux consacrés à la relation existant entre leur structure moléculaire et leur pouvoir bactéricide (64) ou leur activité cancérigène (65) mais les conclusions de ces expériences ne sont pas univoques. Il a seulement été montré de façon assez nette que, pour une induction de lésions cancéreuses, la coplanarité des deux noyaux phényles était une condition essentielle. Dans une autre étude (59), nous avons montré que l'inhibition de la caroténogénèse ne nécessite pas que les noyaux soient coplanaires ni même coaxiaux. Cependant l'influence de la conjugaison entre les cycles semble, en revanche, particulièrement importante.

III - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA CAROTENOGENESE DE RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES ET DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

A - Influence sur la caroténogénèse de Rhodopseudomonas spheroides (souche sauvage)

Dans le tableau 5 sont rassemblés les résultats concernant l'inhibition de la caroténogénèse de Rps. spheroides, obtenue pour une concentration de 165 μ M de 2-OHBP, en fonction du temps de culture et de la nature de la phase gazeuse.

TABLEAU 5

Influence du 2-hydroxybiphényle sur la formation des caroténoïdes de Rhodopseudomonas spheroides

Durée en heures	Conditions	Phytoène	Phytofluène	ξ carotène	autres caroténoïdes	Total
72	N ₂ - CO ₂ lumière	2 000	3 100	1 000	100	6 200
72	N ₂ lumière	2 100	1 350	340	70	3 860
72	H ₂ lumière	2 530	2 400	550	100	5 580
84	N ₂ - CO ₂ lumière	1 800	3 300	2 150	500	7 750
84	air obscurité	0	0	0	2 000	2 000

Les résultats sont exprimés en μ g/g de bactéries (poids sec)

En anaérobiose à la lumière, la nature de la phase gazeuse influence, dans une certaine mesure, le taux des différents caroténoïdes et la quantité totale synthétisée. C'est ainsi qu'en présence d'azote,

les quantités de caroténoïdes sont les plus faibles bien que, dans ce cas, l'inhibition semble se situer plus nettement au niveau du phytoène que dans les autres essais. Lorsque l'anaérobiose est assurée par le mélange N_2-CO_2 , le phytofluène représente le caroténoïde majeur. En revanche, son taux est sensiblement le même que celui du phytoène dans les cultures effectuées sous hydrogène. Il faut enfin souligner que l'ensemble des polyènes incolores (phytoène et phytofluène) peut représenter jusqu'à 90 % des caroténoïdes formés, ce qui confirme l'efficacité remarquable du 2-OHBP.

En aérobiose à l'obscurité, le 2-OHBP inhibe fortement la croissance bactérienne, et aucune inhibition analogue à celle décrite dans le paragraphe précédent n'a pu être constatée. Pour 110 μM de 2-OHBP, il n'y a pas d'accumulation appréciable de phytoène ni de phytofluène et la sphéroïdénone représente le pigment majeur, bien que son taux soit inférieur à celui observé en absence d'inhibiteur*. Pour 165 μM d'inhibiteur, il n'y a aucune croissance bactérienne.

B - Influence sur la caroténogenèse du mutant JV de Rhodopseudomonas spheroides.

Ce mutant de couleur jaune vert est caractérisé par un blocage de la synthèse des caroténoïdes au stade neurosporène (67). Cette caractéristique le rapproche d'un mutant déjà obtenu par GRIFFITHS (68). Ce mutant, stable en anaérobiose à la lumière, tend à réverser en aérobiose à l'obscurité. Cette propriété nous permettait d'envisager un arrêt de la biosynthèse des caroténoïdes au niveau du phytoène en présence d'inhibiteur, peut-être plus efficace que dans le cas de la souche sauvage. En fait, il n'en a rien été et nous avons remarqué au contraire que la croissance de ce mutant est beaucoup plus sensible vis-à-vis du 2-OHBP que celle de la souche sauvage.

* Pour faciliter la compréhension de l'inhibition de la caroténogenèse de Rps. spheroides, le schéma 3 représente le mécanisme le plus généralement admis pour la biosynthèse de la sphéroïdénone.

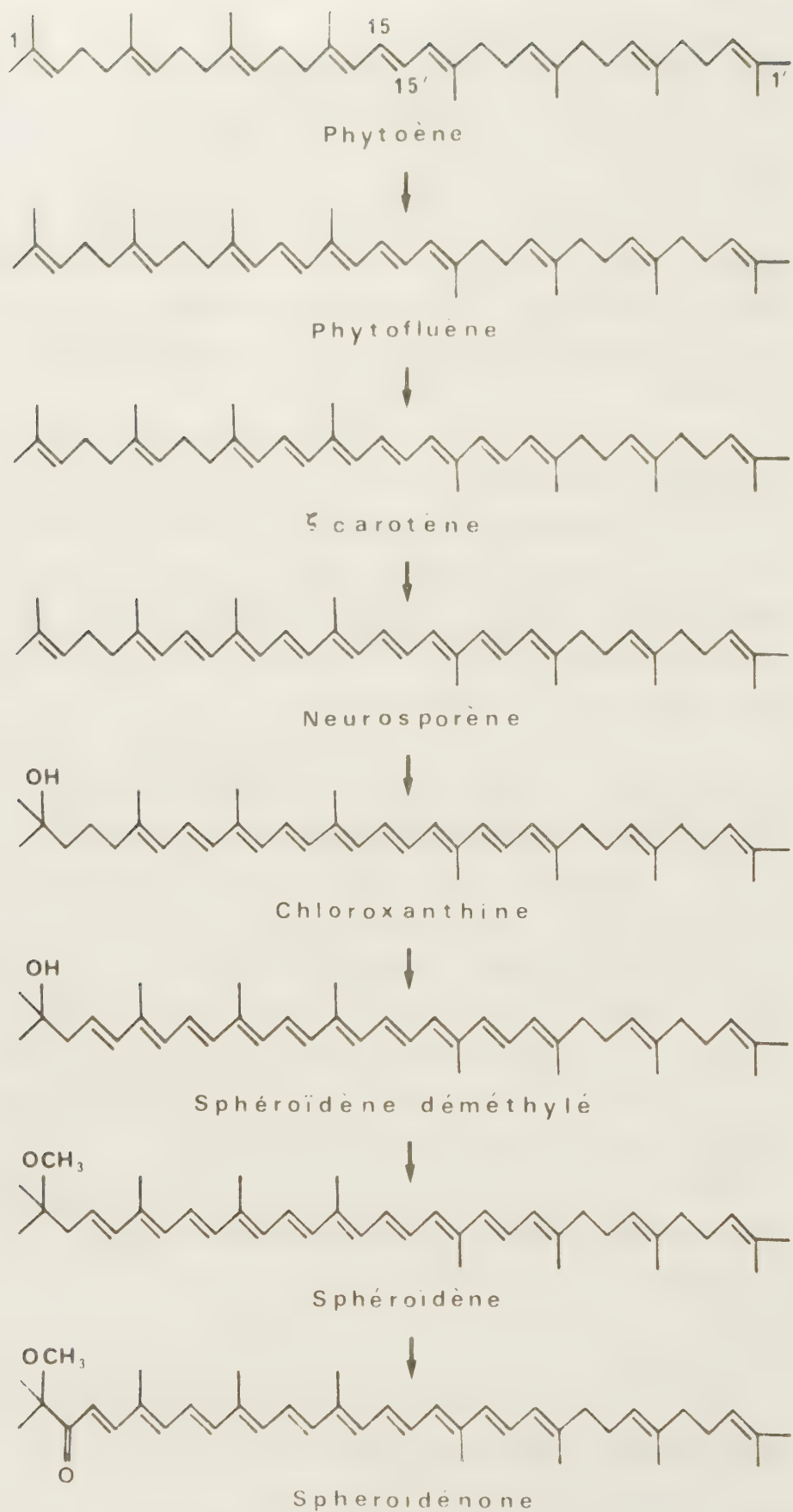


Schéma 3 - Mécanisme de la biosynthèse de la sphéroïdénone
chez Rhodopseudomonas spheroides (66)

Pour une culture de 96 heures en anaérobiose (N_2-CO_2) à la lumière, nous obtenons les quantités suivantes de caroténoïdes exprimées en μg par gramme de bactéries sèches : phytoène 750, phytofluène 2300, ζ carotène 1250, et autres caroténoïdes 1000.

Comme pour la souche sauvage cultivée également à la lumière sous N_2-CO_2 , le phytofluène représente le caroténoïde principal (43 %) alors que, comparativement, la quantité de phytoène a très fortement diminué.

Il faut cependant remarquer que la durée de culture a été relativement longue (96 heures) et que dans le cas de la souche sauvage, une même évolution des pigments peut être constatée lorsque le temps de culture passe de 72 à 84 heures. Cette observation serait en faveur d'une réduction de l'activité anticaroténogène au cours du temps.

C - Influence sur la caroténogenèse de *Rhodospirillum rubrum*

Les caroténoïdes de *Rh. rubrum* ainsi que l'inhibition de leur synthèse ont déjà fait l'objet de nombreux travaux (69, 70). Il nous a semblé intéressant d'étudier l'action du 2-OHBP sur la formation des pigments de cette bactérie appartenant, comme *Rps. spheroides*, aux Athiorhodacées. Le schéma 4 représente le mécanisme de la biosynthèse de la spirilloxanthine chez *Rh. rubrum* (37).

Pour des cultures normales âgées de 48 heures et réalisées sous N_2-CO_2 à la lumière, nous avons obtenu en moyenne les résultats suivants exprimés en pourcentage des caroténoïdes totaux : ζ carotène 0,1, neurosporène 0,4, lycopène 10, rhodopine 15, anhydorhodovibrine 18, rhodovibrine 22 et spirilloxanthine 34,5.

En aérobiose à l'obscurité, on constate que les cultures normales de *Rh. rubrum*, comme celles de *Rps. spheroides*, présentent une croissance et une production de pigments beaucoup plus faibles qu'en anaérobiose à la lumière. En raison de l'inhibition de la croissance en aérobiose, nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude de l'action du 2-OHBP dans les conditions de croissance photosynthétique.

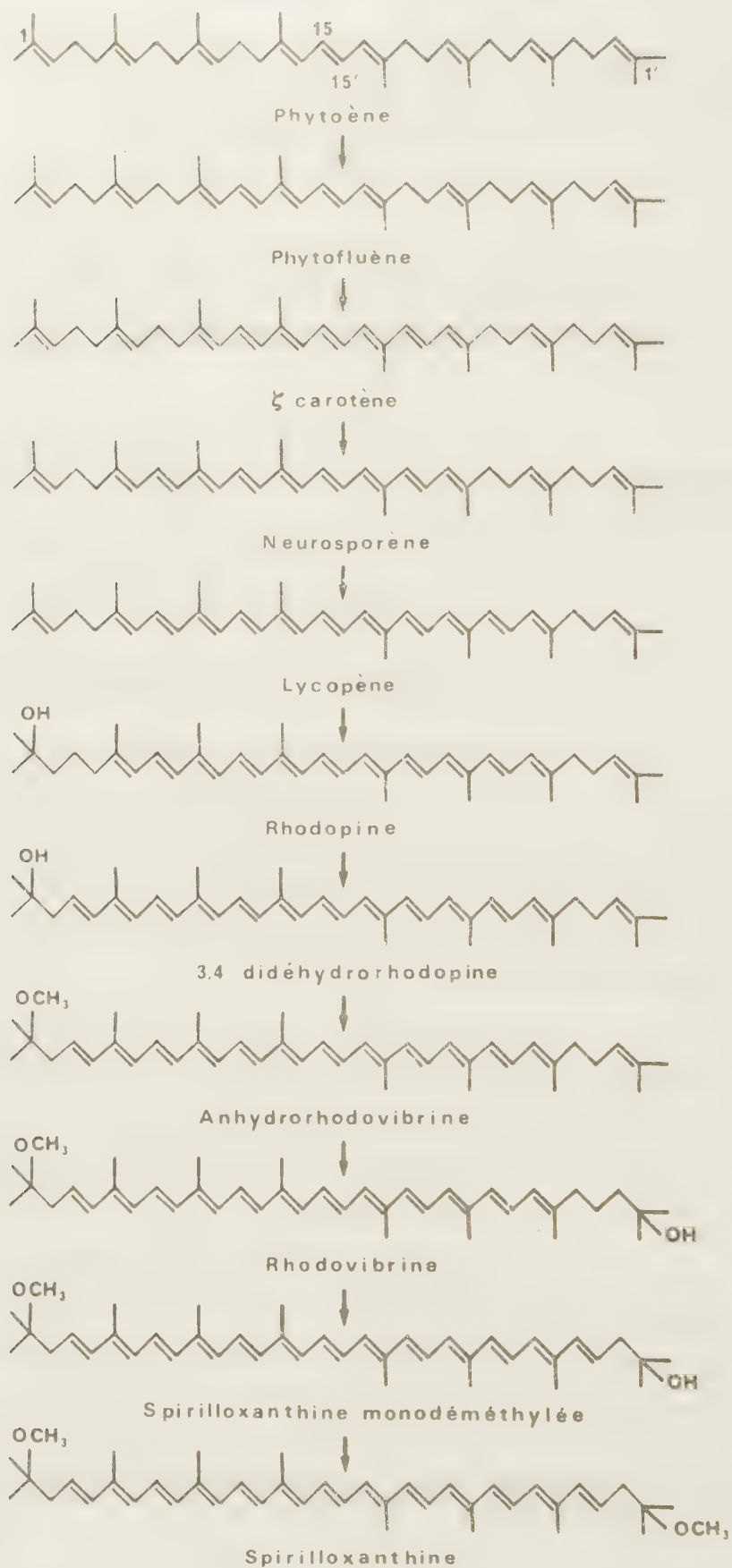


Schéma 4 - Mécanisme de la biosynthèse de la spirilloxanthine
chez Rhodospirillum rubrum

Le tableau 6 reproduit les résultats concernant ces expériences.

TABLEAU 6

Influence du 2-OHBP sur la formation
des caroténoïdes de Rhodospirillum rubrum

Durée en heures	Phase gazeuse	Phytoène	Phytofluène	ζ carotène	autres caroténoïdes	Total
72	N ₂ + CO ₂	1980	220	100	170	2470
84	N ₂ + CO ₂	1840	170	150	270	2430

Bien que pour des concentrations identiques en 2-OHBP la croissance de Rh. rubrum soit plus affectée que celle de Rps. spheroides, l'inhibition de la caroténogenèse présente une intensité encore plus forte.

Il faut tout particulièrement souligner que le phytoène représente jusqu'à 80 % des caroténoïdes totaux et, qu'en valeur absolue, son accumulation est de dix à vingt fois supérieure à celle obtenue par différents auteurs utilisant la DPA (70, 71).

CHAPITRE III

ETUDE DE LA CONFIGURATION DES CAROTENOIDES ACCUMULES

DANS LES BACTERIES CULTIVEES EN PRESENCE DE 2-HYDROXYBIPHENYLE

Le phytoène a été rencontré chez plusieurs microorganismes capables d'effectuer la synthèse des caroténoïdes et on admet qu'il représente le premier polyène conjugué dans la biosynthèse de ces composés. RABOURN et QUACKENBUSH (31) ont proposé pour ce précurseur la structure d'un octahydrolycopène, mais ces auteurs n'ont pas localisé de façon certaine les trois doubles liaisons conjuguées de cette molécule. Plus tard, JUNGALWALA et PORTER ont attribué la configuration 15,15' cis au phytoène naturel (72) et WEEDON, à partir de phytoène de synthèse, a démontré que le système triénique conjugué est bien situé au centre de la molécule (73). Cependant la configuration des doubles liaisons de ce système triénique pose encore de nombreux problèmes. D'après les hypothèses avancées pour la biosynthèse du premier terme en C_{40} , les doubles liaisons portées par les atomes de carbone 13 et 13' devraient être trans, mais en fait leur configuration n'a pas encore été clairement établie.

La première étape dans la désaturation du phytoène conduit au phytofluène qui possède cinq doubles liaisons conjuguées et dont la forme naturelle montre l'existence d'une double liaison cis (32). En raison de l'empêchement stérique, cette double liaison n'est pas située au centre du chromophore, mais au centre de la molécule, comme dans le cas du phytoène. Toutefois, il ne faut pas exclure la possibilité d'une configuration cis de la double liaison 13-14 (74).

A partir du ζ carotène, qui possède sept doubles liaisons conjuguées, la configuration de tous les autres caroténoïdes naturels devient entièrement trans. Cependant il est à noter que la structure d'un tétrahydrolycopène (75) est également compatible avec l'existence d'isomères dissymétriques.

Dans une première partie, nous avons étudié la stéréochimie des précurseurs des caroténoïdes présents dans les bactéries dont la caroténogénèse a été inhibée. En effet, la détermination de la configuration des isomères du phytoène, du phytofluène et du ζ carotène est essentielle à la connaissance du mécanisme de la biosynthèse des caroténoïdes. En outre, nous avons déterminé la structure des principaux caroténoïdes du mutant JV de *Rps. spheroides*.

Comme les précurseurs des caroténoïdes ne peuvent être mis en évidence dans les cultures normales, les bactéries ont été cultivées en présence de 2-OHBP afin d'obtenir une quantité suffisante de ces composés.

I - CONFIGURATION DES ISOMERES DU PHYTOENE

La chromatographie sur colonne d'alumine I Woelm basique permet de séparer nettement deux fractions qui montrent toutes deux une absorption ultraviolette caractéristique d'un triène conjugué. Un tel système est également présent dans le déhydrosqualène, déjà mis en évidence chez Staphylococcus aureus (76) et Halobacterium cutirubrum (77), il est donc indispensable de connaître la masse de ces deux fractions.

A l'aide de la spectrométrie de masse nous obtenons, pour les deux isomères, la même fragmentation. Nous observons ainsi les ions les plus intenses correspondant aux pics à m/e 544 (M) et m/e 339 (M-205). Les ions fragments à m/e 407 (M-137) et m/e 475 (M-69) ont une faible intensité. Ces résultats sont donc en accord avec la fragmentation du phytoène. Il est à noter également que la spectrométrie de masse n'a jamais permis, jusqu'ici, de distinguer les isomères cis et trans d'un même caroténoïde (78).

Le spectre électronique du premier isomère, dans l'éther de pétrole (275, 286, 296 nm) ne présente qu'une inflexion à 296 nm alors que celui du second isomère (275, 286, 296 nm) montre un pic important à cette même longueur d'onde. Une telle absorption ultraviolette correspond bien à un système à trois doubles liaisons conjuguées situé au centre de la molécule. En effet, une autre localisation de ce chromophore entraînerait un effet hypsochromique de 7 nm (73). Ces premières constatations font penser que ces deux isomères possèdent respectivement la configuration cis et trans au niveau de la double liaison centrale (72). De plus, l'absence de déplacement bathochromique lors de l'isomérisation du phytoène naturel avait déjà été observée par JUNGALWALA et PORTER (72).

En spectroscopie infrarouge, le premier isomère montre une bande intense à 765 cm^{-1} , caractéristique d'une double liaison cis disubstituée, tandis que le second présente une absorption intense à 960 cm^{-1} , propre à une configuration trans de la double liaison centrale (74).

Bien que la configuration des doubles liaisons isolées de la molécule de phytoène ait déjà été étudiée par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton, la configuration du système triénique

central n'a jamais été abordée jusqu'ici de façon approfondie à l'aide de cette même technique. C'est pourquoi nous avons étudié la stéréochimie du triène conjugué des isomères du phytoène d'une part à l'aide de la RMN du proton (79), et d'autre part à l'aide de la RMN de l'isotope 13 du carbone (80) (teneur naturelle).

A - Spectres de RMN du proton des isomères du phytoène

1) Phytoène cis (figure 1)

Les différents déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm, à partir du TMS utilisé comme référence interne. Les protons méthyliques situés sur les doubles liaisons isolées donnent une raie à $\delta = 1,60$ ppm. Les protons des groupes isopropylidènes terminaux montrent respectivement deux raies à $\delta_{\text{cis}} = 1,62$ ppm et à $\delta_{\text{trans}} = 1,68$ ppm.

Les protons des deux groupes méthyles portés par les atomes de carbone 13,13' et situés de part et d'autre du système triénique central correspondant à $\delta = 1,76$ ppm. Les protons méthyléniques sont dans une raie large à 2,07 ppm. Les protons oléfiniques situés sur les doubles liaisons isolées donnent une raie à 5,09 ppm.

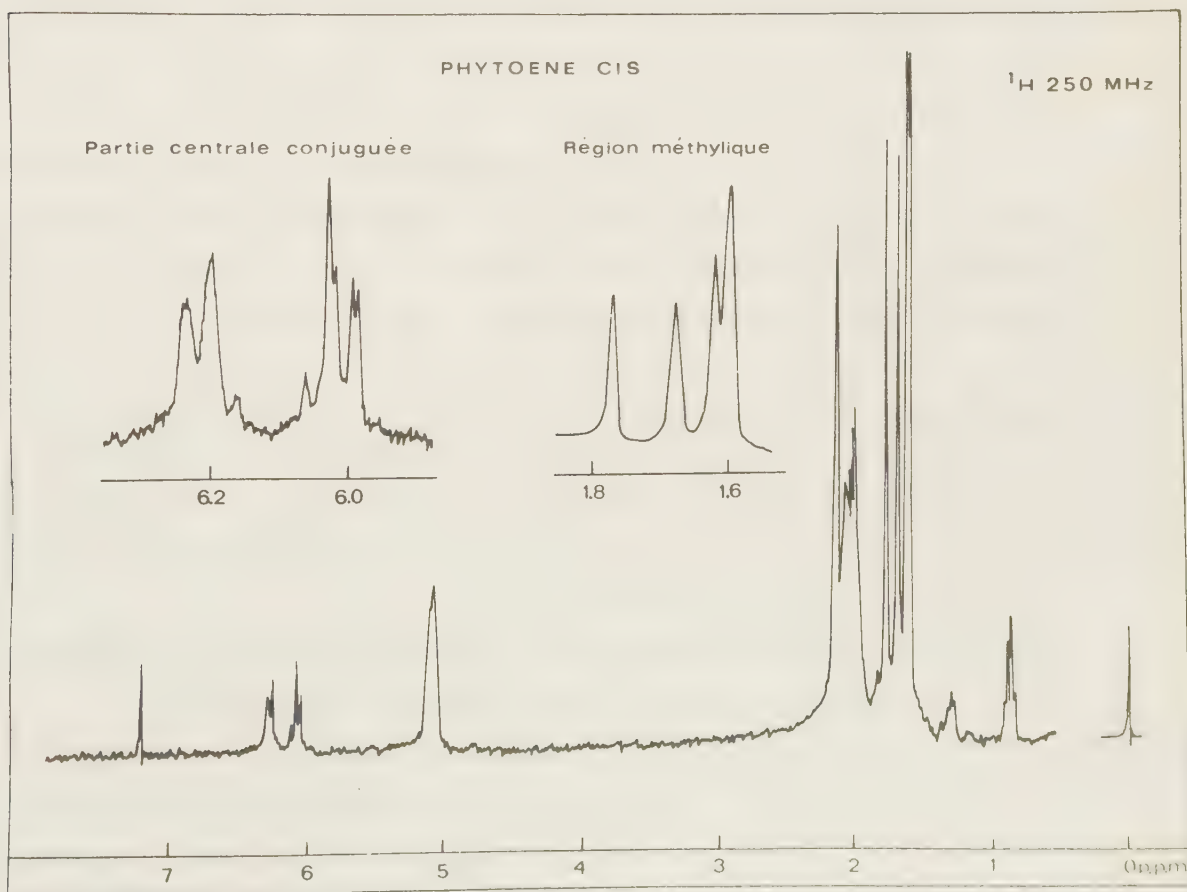


Figure 1 : Spectre de RMN du proton du phytoène cis à 250 MHz

Les spectres de RMN du proton des isomères du phytoène montrent, en ce qui concerne la région triénique centrale, une certaine complexité qui rend difficile la mesure des paramètres. Seul le calcul complet permet de les atteindre. Ainsi, tous les spectres de RMN peuvent être calculés par la mécanique quantique qui nous fournit les équations du problème. Il existe actuellement plusieurs méthodes itératives (81) mais celles-ci nécessitent des ordinateurs puissants. GRANGER (82) a écrit des programmes pour calculateurs moins importants, ce qui l'a conduit à concevoir un schéma itératif entièrement nouveau.

A partir de quelques paramètres initiaux, on calcule un spectre d'essai ce qui permet de construire un diagramme des énergies servant de base au calcul itératif. Par une méthode d'accroissement fini, on affine les paramètres et on obtient les valeurs des déplacements chimiques δ et des constantes de couplage J . Pour s'assurer que la solution trouvée est effectivement la meilleure, on calcule à nouveau le spectre avec les paramètres finaux trouvés précédemment et après simulation sur ordinateur on le compare au spectre expérimental.

Cependant cette technique ne doit pas être surestimée. Elle exige en effet une certaine connaissance initiale du système étudié afin de fixer des valeurs pour les déplacements chimiques et les couplages qui seront ensuite améliorées par itération.

Dans la molécule de phytoène, le système formé par les quatre protons du triène central est du type AA'BB'. Dans de tels systèmes, les protons AA' sont isochrones, c'est-à-dire qu'ils ont le même déplacement chimique. Cependant, leurs couplages aux autres noyaux n'étant pas identiques ($J_{AB} \neq J_{A'B'}$), ils ne sont pas magnétiquement équivalents. Après analyse sur ordinateur et examen des spectres à 250 MHz, les résultats suivants ont été obtenus : pour les protons 14, 14', $\delta = 6,304$ ppm, pour les protons 15, 15', $\delta = 6,096$ ppm. La constante de couplage $J_{H15-15'} = 11,3$ Hz confirme la configuration cis de la double liaison centrale. Par ailleurs $J_{H14-14'} = 0,6$ Hz, $J_{H14-15} = 11,7$ Hz et $J_{H14-15'} = 1,5$ Hz. Les raies des protons 14 et 14' sont élargies par suite du couplage avec les groupes méthyles adjacents.

2) Phytoène trans (figure 2)

Le spectre de RMN du proton de cet isomère est très difficile à interpréter si l'on admet que seul l'isomère all trans du phytoène est présent dans l'échantillon étudié. En raison de la difficulté d'isolement du phytoène all trans à l'état pur, il est plus vraisemblable d'admettre que nous avons affaire à un mélange contenant surtout l'isomère all trans mais aussi d'autres isomères cis et trans du phytoène. Les protons méthyliques situés sur les doubles liaisons isolées se déplacent à 1,59 ppm tandis que les protons des groupes isopropylidènes terminaux montrent une raie à 1,61 ppm et à 1,67 ppm, valeurs semblables à celles des protons méthyliques correspondants du phytoène cis.

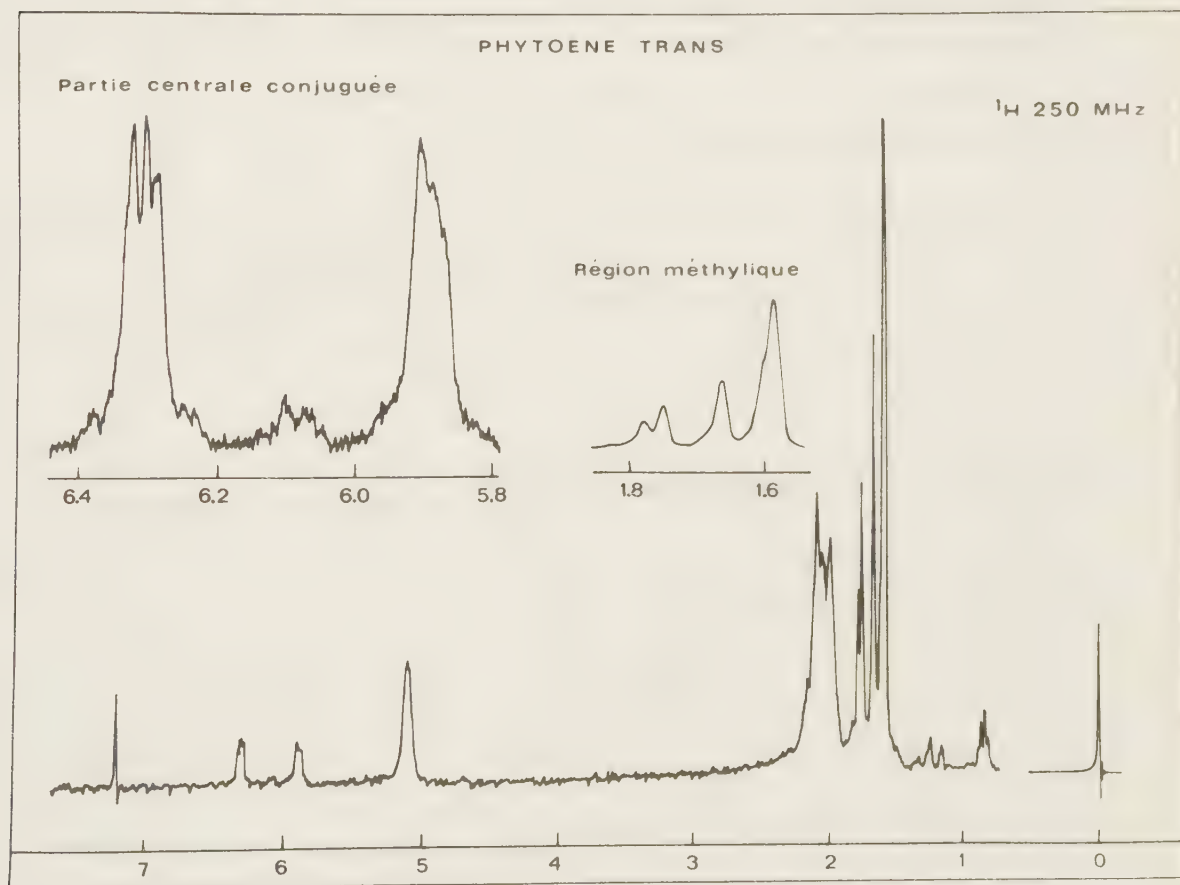


Figure 2 : Spectre de RMN du proton du phytoène trans à 250 MHz

Cependant, les déplacements chimiques des protons méthyliques portés par les atomes de carbone 13 et 13' sont différents de ceux

observés pour le phytoène cis. En effet, si la molécule était symétrique, ces deux groupes méthyles n'auraient donné qu'un seul signal à 1,76 ppm, comme dans le cas de l'isomère cis, or il n'en est pas de même pour la fraction phytoène trans.

Afin d'identifier les différents isomères susceptibles de contaminer le phytoène trans, nous avons étudié également la fraction chromatographique éluée entre le phytoène cis et le phytoène trans. Cette fraction contient en fait un mélange d'isomères et montre trois signaux différents à 1,76, 1,78 et 1,83 ppm qui sont attribués aux groupes méthyles portés par les atomes de carbone 13 et 13' (figure 3). Les déplacements chimiques des protons 14,15 et 14',15' suggèrent que le mélange consiste principalement en isomères dont la double liaison centrale possède la configuration cis. Le signal à 1,76 ppm correspond au méthyle de l'atome de carbone 13 ou 13' en position cis, tandis que les raies à 1,78 et 1,83 ppm sont attribuées à ce même méthyle en position trans.

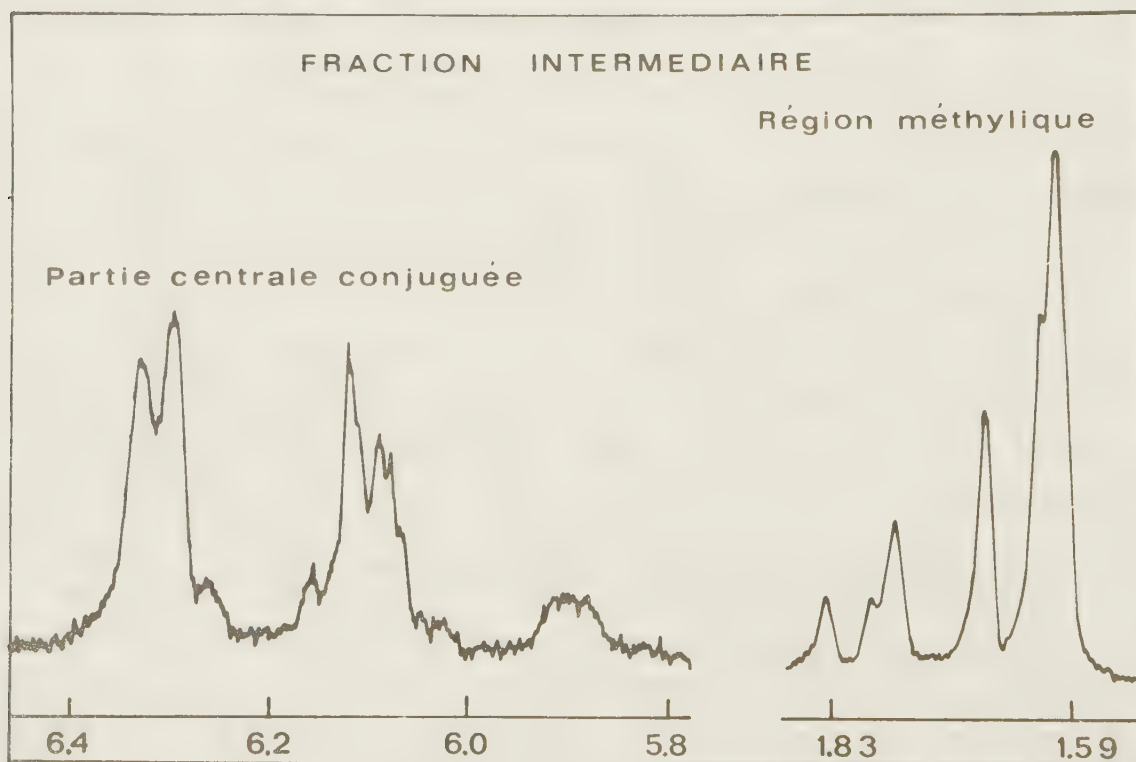


Figure 3 : Spectre de RMN à 250 MHz du proton de la fraction chromatographique éluée entre le phytoène cis et le phytoène trans

En conséquence, l'isomère qui, dans la fraction phytoène trans, fournit une raie à 1,76 ppm, possède une double liaison de configuration trans, la configuration cis de cette même double liaison étant attribuée à l'isomère responsable du signal à 1,78 ppm.

Comme dans le cas de l'isomère cis, les protons méthyléniques de l'isomère trans donnent une raie large à 2,04 ppm tandis que les protons oléfiniques des doubles liaisons isolées se rencontrent à 5,09 ppm. Pour le système triénique central, $\delta_{H 15,15'} = 6,32$ ppm tandis que $\delta_{H 14,14'} = 5,88$ ppm. La valeur de la constante de couplage J entre les protons 15 et 15' est égale à 15 Hz ce qui est en accord avec une configuration trans de la double liaison centrale. De plus la constante de couplage $J_{H 14-15}$ a été évaluée à 11 Hz. Cette valeur est voisine de celle obtenue pour le couplage correspondant des protons 14 et 15 dans le cas du phytoène cis.

TABEAU 7

Comparaison des δ des protons 14,14' et 15,15'
des isomères cis et trans du phytoène
avec les isomères correspondants du β carotène

Isomère	Protons	Phytoène δ_1	β carotène δ_2	$\delta_2 - \delta_1$
15 cis	14,14'	6,30	6,65	0,35
	15,15'	6,10	6,39	0,29
all trans	14,14'	5,88	6,24	0,36
	15,15'	6,32	6,63	0,31

Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm.

Le tableau 7 montre une inversion des déplacements chimiques pour les protons 14,14' et 15,15', quand on passe du dérivé cis au dérivé trans, comparable à celle obtenue pour les isomères 15 cis et all trans du β carotène (83). Les valeurs obtenues pour les protons des différents groupes méthyles sont en accord avec les travaux antérieurs (73)

et nos résultats concernant le système triénique central du phytoène viennent d'être très récemment confirmés à l'aide de modèles synthétiques (84).

De plus on peut noter que la présence d'un système à onze doubles liaisons conjuguées dans la molécule de β carotène a un effet de déblindage sur les protons oléfiniques.

B - Spectres de RMN de l'isotope 13 du carbone des isomères du phytoène

A côté de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton, celle de l'isotope 13 du carbone connaît un développement de plus en plus important et permet de résoudre des problèmes de stéréochimie restés inaccessibles jusqu'ici. La faible abondance naturelle de cet isotope (environ 1 %) et les temps de relaxation spin-réseau élevés avaient considérablement retardé l'utilisation de cette technique. Ces difficultés ont été extrêmement réduites grâce à l'application de la technique dite de transformation de FOURIER. Dans le cas de la spectroscopie classique, à tout instant, un seul point du spectre est observé pendant le balayage en champ ou en fréquence. En revanche, dans la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C les noyaux sont irradiés, de façon simultanée et répétitive, avec une large bande de fréquence produite par des impulsions de courte fréquence radio également espacées. Ceci réduit considérablement le temps nécessaire pour obtenir un rapport signal/bruit de fond donné. Les signaux correspondant à chaque impulsion sont ensuite accumulés, par transformation de FOURIER, à l'aide d'un ordinateur relié au spectromètre. Ce n'est qu'en 1970 que les spectres de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C , de l'acétate de vitamine A, du β carotène 15,15' cis, du β carotène all trans et du 15,15' déhydro β carotène ont été réalisés (85).

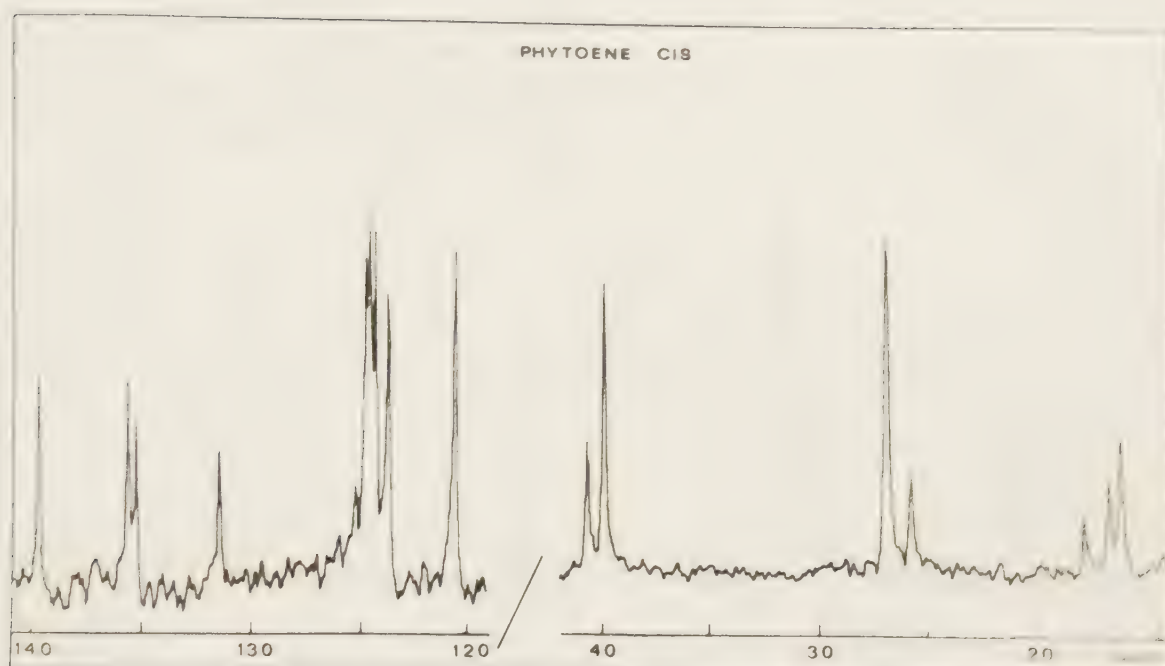


Figure 4 : Spectre de RMN du ^{13}C du phytoène cis à 22,63 MHz

Ce spectre est le résultat de l'accumulation de 65 500 enregistrements.

La figure 4 représente le spectre de RMN du ^{13}C du phytoène cis et la figure 5 représente celui d'un mélange dans lequel l'isomère *all* trans domine. Les pics parasites sont signalés sur le spectre de la figure 5 à l'aide de flèches. Celles-ci correspondent à la contribution apportée par les isomères du phytoène dont la double liaison 13-14 ou 13'-14' possèdent la configuration cis.

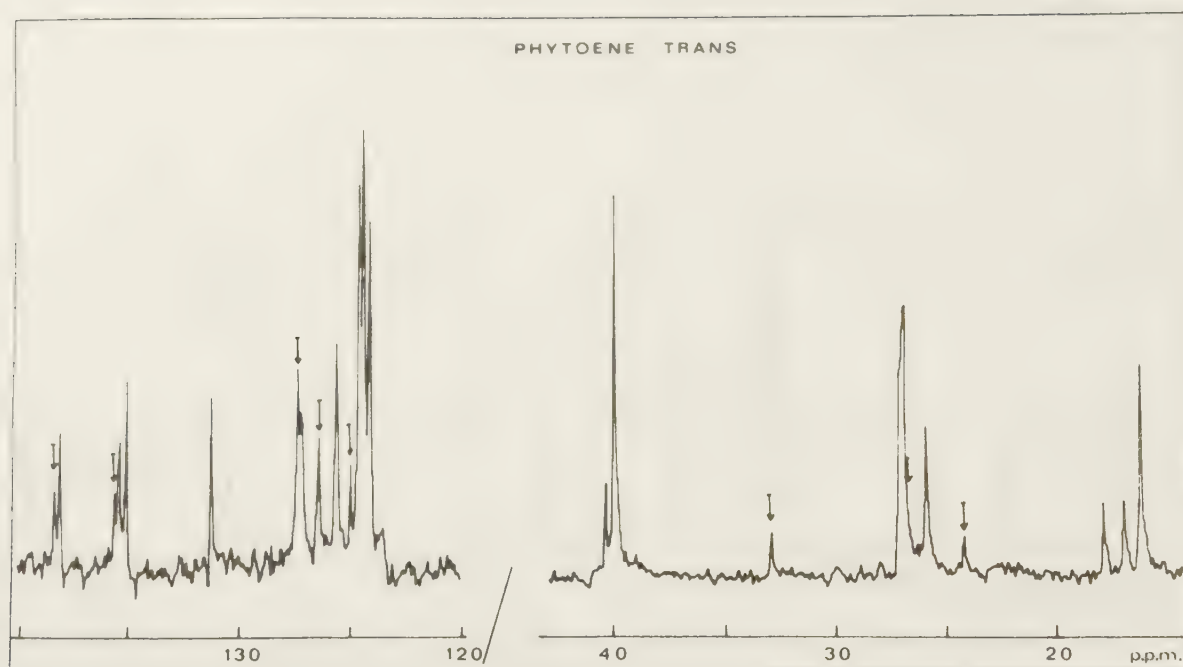


Figure 5 : Spectre de RMN du ^{13}C du phytoène trans à 22,63 MHz

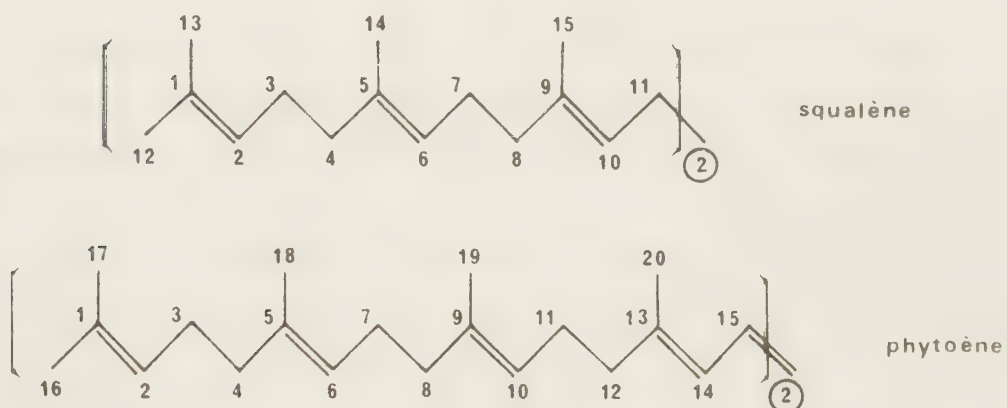
Ce spectre est le résultat de l'accumulation de 81 400 enregistrements.

Les différentes valeurs obtenues pour les déplacements chimiques des atomes de carbone (^{13}C) du phytoène cis et du phytoène trans ont été comparées, d'une part avec celles du squalène (86), en ce qui concerne la configuration des doubles liaisons isolées (tableau 8) et, d'autre part, avec celles des isomères cis et trans du β carotène (85) pour la configuration des doubles liaisons conjuguées (tableau 9).

De la comparaison avec le squalène, il ressort que toutes les doubles liaisons isolées des isomères cis et trans du phytoène possèdent bien la configuration trans. De plus les déplacements chimiques observés pour les différents atomes de carbone de la région triénique du phytoène cis et du phytoène trans sont voisins de ceux obtenus dans le cas des atomes correspondants du β carotène cis et du β carotène trans.

TABLEAU 8

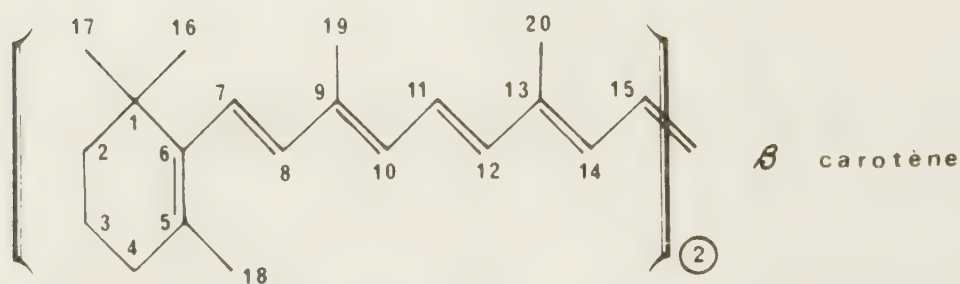
Valeurs des déplacements chimiques des différents atomes de carbone (^{13}C) des isomères du phytoène et du squalène



Carbone	Phytoène 15_15' cis	Phytoène all trans	Carbone	Squalène
1	131.37	131.37	1	130.9
2	124.22	124.22	2	125.1
3	27.00	26.87	3	27.3
4	39.93	39.93	4	40.2
5	135.14	135.14	5	135.1
6	124.48	124.48	6	124.9
7	27.00	26.87	7	27.2
8	39.93	39.93	8	40.2
9	135.53	135.26	9	134.9
10	124.68	124.68	10	124.9
11	27.00	26.87	11	28.7
12	40.71	40.71	12 trans	25.8
13	123.64	127.34	13 cis	17.8
14	120.52	125.72	14	16.2
15	139.62	138.26	15	16.2
16 trans	25.83	25.83		
17 cis	17.84	17.84		
18	16.21	16.21		
19	16.21	16.21		
20	16.73	16.93		

TABLEAU 9

Valeurs des déplacements chimiques des différents atomes
de carbone (^{13}C) des isomères du β carotène



Carbone	β carotène 15_15' cis	β carotène all trans
1	34,5	34,5
2	40,2	40,2
3	20,1	20,2
4	33,7	33,7
5	138,3	138,3
6	138,3	138,3
7	136,0	135,7
8	126,8	126,7
9	137,2	136,4
10	126,1	125,7
11	131,9	133,1
12	127,7	129,3
13	122,4	131,7
14	125,8	130,5
15	138,1	137,8
16	29,3	29,2
17	29,3	29,2
18	22,2	22,2
19	13,0	13,0
20	12,8	13,0

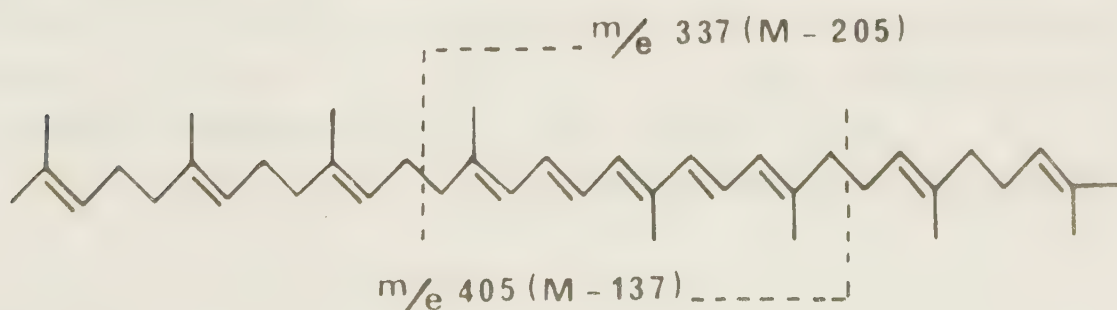
Nous remarquons, pour le β carotène, que les déplacements chimiques des atomes de carbone qui sont éloignés du site d'isomérisation sont relativement peu affectés par le changement de configuration de la double liaison centrale. Par ailleurs les atomes de carbone en position β d'un groupe méthyle apparaissent à des champs supérieurs à ceux des atomes de carbone qui sont dans une position encore plus éloignée. Ce phénomène a été démontré pour des composés éthyléniques simples et semble s'étendre aux systèmes conjugués. Ainsi la résonance des atomes de carbone 7, 11 et 15 est située à des champs faibles et c'est ce qui a permis de différencier les atomes de carbone 7 et 8 du β carotène. Le fait que l'atome de carbone 11 soit situé vers le champ le plus élevé, parmi les atomes de carbone porteurs d'un proton, est une conséquence de l'interaction stérique entre le proton fixé sur ce carbone et les groupes méthyliques des atomes de carbone 19 et 20 (85).

II - PHYTOFLUENE

Par chromatographie sur colonne d'alumine, nous obtenons un premier composé, en quantité assez faible, qui présente le même spectre électronique que le phytofluène décrit dans la littérature. En effet, le rapport des intensités d'absorption mesurées à 348 et à 365 nm, dans l'éther de pétrole, est égal à 1,16, valeur indiquée par KOE et ZECHMEISTER pour l'isomère 15 cis (32).

Le second isomère, quantitativement le plus important, présente, dans les mêmes conditions, un effet bathochromique de l'ordre de 1 à 2 nm par rapport à l'isomère cis et un rapport égal à 1,04 caractéristique du composé entièrement trans.

Par ailleurs, le spectre de masse de ces deux isomères confirme que les deux composés répondent à la formule brute $C_{40}H_{62}$ ci-dessous.



Enfin le spectre de RMN du proton à 60 MHz nous a donné la valeur des déplacements chimiques des différents protons méthyliques représentés ci-dessous (figure 6).

Pour des raisons de stabilité, seul l'isomère all trans a pu être examiné.

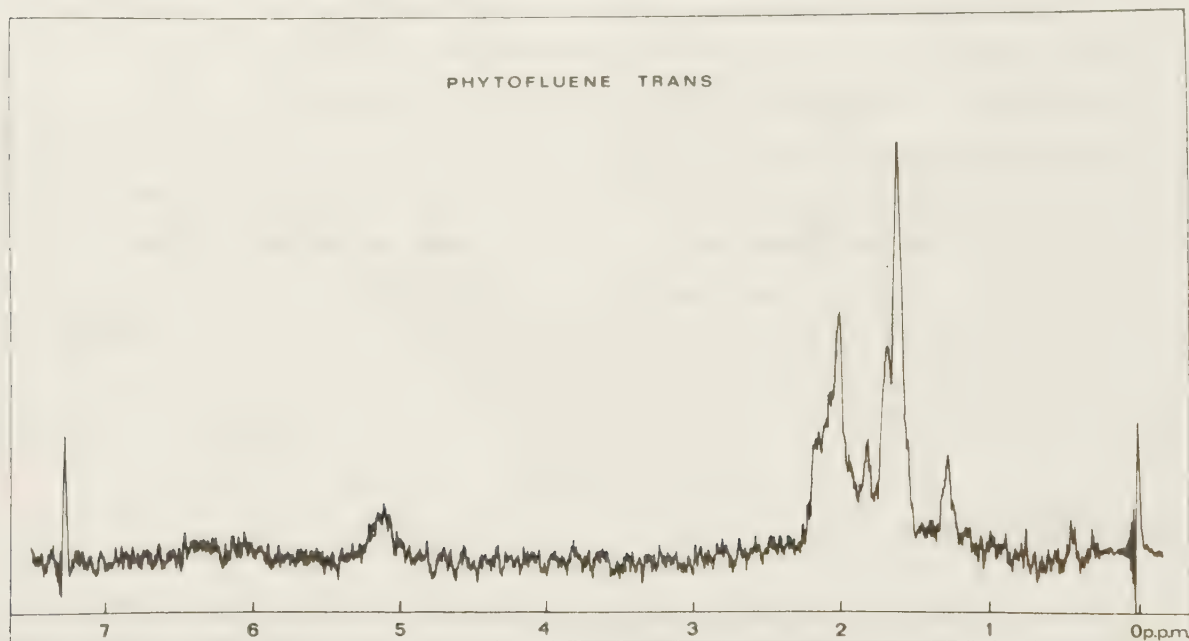


Figure 6 : Spectre de RMN du proton du phytofluène trans à 60 MHz

Les protons des groupes isopropylidènes terminaux possèdent les déplacements chimiques $\delta_{\text{cis}} = 1,57$ ppm et $\delta_{\text{trans}} = 1,65$ ppm. Les protons méthyliques situés sur les doubles liaisons isolées se déplacent à 1,57 ppm tandis que les protons méthyliques situés en bout de la chaîne des doubles liaisons conjuguées montrent une raie à 1,77 ppm. Les protons méthyliques situés dans la chaîne polyénique se déplacent à 1,93 ppm.

Les protons méthyléniques donnent une raie large vers $\delta = 2,06$ ppm. En raison de la complexité des raies correspondant aux protons de la chaîne polyénique conjuguée, les protons oléfiniques n'ont pas été étudiés.

Tous ces résultats sont en parfait accord avec ceux déjà obtenus pour ce caroténoïde (73).

III - ζ CAROTENE

A partir de cultures de *Rh. rubrum* effectuées en présence de DPA, DAVIES (75) a pu mettre en évidence du ζ carotène dont le chromophore n'est pas situé au centre de la molécule. Nous avons remarqué que les cultures de *Rps. spheroides* inhibées par le 2-OHBP accumulent des quantités importantes de ζ carotène. Il est donc intéressant de comparer la structure de cet heptaène conjugué à celle décrite ci-dessus. Cependant, il importe de signaler avant tout l'extrême sensibilité de cet hydrocarbure en ce qui concerne l'isomérisation.

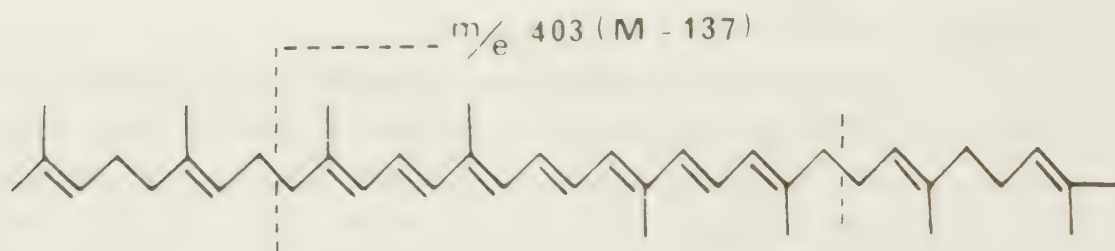
Sur colonne de magnésie-hyflosupercel, nous isolons un premier isomère qui existe en faible quantité et dont le spectre électronique présente, dans l'éther de pétrole, les maxima d'absorption situés à 375, 396, 420 nm avec un double pic à 284 et 296 nm caractéristique d'une isomérisation *cis* de la double liaison centrale (74). Ceci se trouve confirmé par le spectre d'absorption infrarouge qui montre une bande à 780 cm^{-1} et par le rapport des intensités d'absorption à 420 et à 396 nm qui est égal à 0,90.

Le spectre électronique à 378, 399 et 423 nm du second isomère, particulièrement abondant, présente par rapport au précédent un déplacement bathochromique de 3 nm. De plus, le rapport des intensités d'absorption à 423 et 399 nm est de 1,01. Enfin l'isomérisation par l'iode de ce composé a lieu très rapidement et le spectre présente alors un déplacement hypsochromique de 3 nm avec apparition d'un double pic "*cis*" à 284 et 296 nm.

Le spectre infrarouge ne montre aucune bande dans la région 780 cm^{-1} mais présente en revanche une très forte absorption à 960 cm^{-1} . Tous ces faits sont donc en faveur d'une configuration *all trans* pour ce dernier isomère. De plus son spectre de masse présente la même fragmentation que le ζ carotène symétrique (78). En effet, nous obtenons les ions fragments suivants à m/e 540 (M), m/e 403 (M-137) et un ion métastable très important à m/e 301 qui correspond à $(403)^2/540$. Contrairement aux résultats de DAVIES, nous n'obtenons pas de ζ carotène dissymétrique dans les cultures inhibées.

En effet, bien que nous obtenions un ion fragment à m/e 205 (M-335) de très faible intensité, les conditions expérimentales n'ont pas permis de mettre en évidence, dans le spectre, un pic métastable à 208 qui correspond à une transition de l'ion moléculaire de masse 540 pour donner un ion fragment à m/e 335 avec $(335^2/540 = 207,8)$.

La principale fragmentation d'une molécule de ζ carotène est représentée ci-dessous.

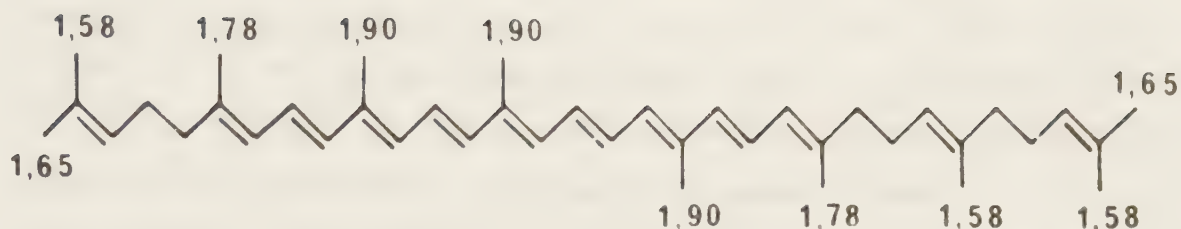


IV - ETUDE DES CAROTENOIDES DU MUTANT JV DE RHODOPSEUDOMONAS SPHEROIDES

Contrairement à d'autres mutants que nous avons pu isoler, celui-ci semble posséder une assez bonne stabilité et nous nous sommes intéressés à la détermination structurale de ses principaux caroténoïdes.

Sur alumine Merck II/III, un pigment majeur s'élue avec 5 % ES dans EP. Son spectre électronique, dans l'éther de pétrole, présente des maxima situés à 415, 436, 469 nm. Une telle absorption est compatible avec un système possédant neuf doubles liaisons conjuguées. Le spectre de masse met en évidence un ion moléculaire à m/e 538 (M) et des pics à m/e 401 (M-137) et à m/e 469 (M-69). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux déjà décrits (78) pour le neurosporène ($C_{40}H_{58}$).

La représentation ci-après montre les déplacements chimiques des différents protons méthyliques obtenus par la RMN du proton à 60 MHz. Ces valeurs sont en accord avec une configuration trans pour les doubles liaisons de ce composé (73).



Sur le même adsorbant un pigment plus polaire s'élue avec 10 % ES et donne un spectre d'absorption visible, identique à celui du neurosporène. Le spectre infrarouge présente une bande nette à 3630 cm^{-1} , caractéristique d'un groupement hydroxyle. Le spectre de masse de ce composé montre un ion moléculaire à m/e 556 (M) et les ions à m/e 538 (M-18), m/e 464 (M-92) et m/e 450 (M-106). Les ions fragments à m/e 92 et m/e 106 proviennent de la rupture et de la cyclisation de la chaîne conjuguée, respectivement en toluène et xylène. De plus, le spectre de RMN du proton à 60 MHz possède une raie nette à $\delta = 1,13\text{ ppm}$ qui correspond à 6 protons méthyliques situés à proximité d'un groupement hydroxyle.

Ces résultats sont en accord avec la structure du 1-hydroxy-1,2-dihydroneurosporène (78).

Un composé encore plus polaire s'élue avec 50 % ES et présente un spectre d'absorption dans le visible compatible avec un caroténoïde possédant un chromophore à onze doubles liaisons conjuguées (max dans l'éther de pétrole : 446, 474, 506 nm). Le spectre de masse de ce composé met en évidence les pics suivants à m/e 554 (M-18), m/e 536 (M-18-18), m/e 480 (M-92), m/e 448 (M-106-18) et les ions à m/e 59, m/e 73 et m/e 83.

Cette fragmentation représentée ci-dessous est en accord avec celle du 1,1'-dihydroxy-2,2'-dihydrolycopène (87).



Enfin un composé très adsorbé, ne s'éluant qu'avec 10 % de méthanol dans l'éther sulfurique, n'a pu être déterminé avec certitude. Par analogie avec d'autres résultats (88), nous pensons qu'il s'agit d'un glucoside dont l'aglycone serait un mono ou dihydroxy ζ carotène.

Chez ce mutant, le neurosporène représente donc le pigment principal et la présence d'un dérivé du lycopène nous laisse envisager une possibilité de diversion des voies biosynthétiques vers des composés qui ne se rencontrent habituellement pas dans le genre Rhodopseudomonas.

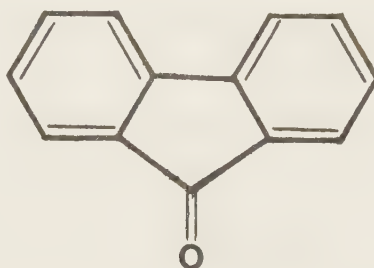
CHAPITRE IV

PHOTOISOMERISATION DU PHYTOENE

PAR LA 9-FLUORENONE

I - EXPOSE DES RESULTATS OBTENUS "IN VIVO" CHEZ RHODOSPIRILLUM
RUBRUM ET "IN VITRO" EN SOLVANT ORGANIQUE.

Dans des travaux récents (89) des quantités importantes de phytoène all trans ont été obtenues chez Mucor hiemalis cultivé en présence de substances anticaroténogènes. L'accumulation de cet isomère est fonction des conditions d'éclairement et de la nature de l'inhibiteur de la caroténogénèse utilisé. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec la 9-fluorénone dont la formule est représentée ci-dessous



Pour notre part, nous avons cherché à reproduire, avec *Rh. rubrum*, les expériences déjà réalisées avec Mucor hiemalis. Comme nous l'avons vu précédemment, la 9-fluorénone est très toxique pour cette bactérie, c'est pourquoi nous avons dû utiliser un artifice pour l'incorporer au milieu de culture. Dans un premier temps, nous avons cultivé *Rh. rubrum*, en présence de 2-OHBP, en anaérobiose à la lumière, pendant 72 heures. A ce stade, une partie de cette culture a été traitée afin d'en déterminer le contenu en isomères cis et trans du phytoène (Essai 1), l'autre partie a été soigneusement lavée avec une solution de tampon phosphate pH 7 afin d'en éliminer le 2-OHBP. Les cellules sont ensuite mises en suspension dans du tampon phosphate renfermant $2,7.10^{-4}$ M de 9-fluorénone. L'ensemble est alors agité sous courant d'azote pur, afin de maintenir l'anaérobiose, et éclairé avec le dispositif décrit dans la partie expérimentale. Cette opération se prolonge pendant 24 heures au maximum puis les caroténoïdes sont purifiés par chromatographie sur colonne et dosés selon le procédé habituel (Essai 2).

TABLEAU 10

Influence de la nature de l'inhibiteur de la caroténogénèse
sur l'accumulation du phytoène trans
chez *Rh. rubrum* cultivé en anaérobiose à la lumière

Essais	Durée en heures	Inhibiteur	Quantité d'inhibiteur	A	B	% $\frac{B}{A + B}$
1	72	2-hydroxy-biphényle	$1,7 \cdot 10^{-4}$ M	2280	260	11
2	24	9-fluorénone	$2,7 \cdot 10^{-4}$ M	1260	1125	47
3	48	2-hydroxy-biphényle	$1,7 \cdot 10^{-4}$ M			
	puis 48	9-fluorénone	$5,4 \cdot 10^{-4}$ M	300	700	70

A : phytoène cis

B : phytoène trans

Dans une autre expérimentation, nous avons cultivé *Rh. rubrum* en présence de 2-OHBP puis, après 48 heures, nous avons ajouté la 9-fluorénone et laissé l'ensemble pendant 48 heures supplémentaires sous forte illumination en anaérobiose. Le tableau 10 rassemble les résultats obtenus dans ces deux séries d'expériences et le tableau 11 reproduit les principales caractéristiques de l'absorption ultraviolette des isomères cis et trans du phytoène, après purification chromatographique (Essai 3).

TABLEAU 11

Rapport des intensités d'absorption des isomères du phytoène

Phytoène 15 cis			Phytoène all trans		
$\frac{\epsilon_{\lambda_2}}{\epsilon_{\lambda_1}}$	$\frac{\epsilon_{\lambda_2}}{\epsilon_{\lambda_3}}$	$\frac{\epsilon_{\lambda_3}}{\epsilon_{\lambda_1}}$	$\frac{\epsilon_{\lambda_2}}{\epsilon_{\lambda_1}}$	$\frac{\epsilon_{\lambda_2}}{\epsilon_{\lambda_3}}$	$\frac{\epsilon_{\lambda_3}}{\epsilon_{\lambda_1}}$
1,220	1,226	0,880	1,324	1,300	1,018

Les rapports sont établis pour l'intensité des maxima d'absorption correspondant aux longueurs d'onde suivantes :

$$\lambda_1 = 275 \text{ nm}, \quad \lambda_2 = 285 \text{ nm}, \quad \lambda_3 = 296 \text{ nm}$$

(Les spectres sont réalisés dans l'éther de pétrole)

L'augmentation de phytoène all trans, dans les cellules éclairées au repos, en présence de 9-fluorénone nous incite à penser à un phénomène d'isomérisation du phytoène photosensibilisé par la 9-fluorénone (90).

Afin de limiter au maximum la production de phytoène trans par voie enzymatique, nous avons multiplié les expériences de photoisomérisation "in vivo" à température relativement basse (+ 5°C), tout en maintenant les conditions d'anaérobiose et d'éclairement précédemment décrites. Dans ces conditions nous n'observons aucun phénomène de lyse bactérienne.

Malgré des pertes en pigments non négligeables, dans ce cas, les quantités d'isomère trans obtenues sont toujours particulièrement élevées en présence de 9-fluorénone.

Par ailleurs, nous avons réalisé des expériences de photoisomérisation "in vitro" de phytoène cis et de phytoène trans en présence de quantités équivalentes de 9-fluorénone (de l'ordre de 10^{-5} M). Le solvant utilisé est de l'éther de pétrole sans benzène. Afin de maintenir les conditions aussi voisines que possible des conditions de culture, les récipients utilisés sont en verre "Pyrex" qui, opaque au-dessous de 285 nm,

transmet respectivement 50 % et 75 % de la lumière à 300 et 335 nm, pour une épaisseur de 2 mm.

L'éclairement est le même que celui des cultures (10 000 lux environ) et les isomérisations ont lieu, sous azote, pendant des durées variables n'excédant jamais 24 heures. Afin d'éviter un échauffement des solutions, un écran d'eau de 10 cm d'épaisseur est placé devant le dispositif d'éclairage.

Dans ces conditions et en l'absence de photosensibilisateur, nous n'avons jamais observé d'isomérisation du phytoène cis même après une forte illumination prolongée sous azote.

Parmi les différentes substances utilisées (DPA, 2-OHBP, benzophénone), la 9-fluorénone a donné les meilleurs rendements d'isomérisation du phytoène cis en phytoène trans. En effet, après quelques heures d'éclairement, on obtient un état photostationnaire qui comprend environ 70 % d'isomère trans du phytoène. Dans les mêmes conditions, ce dernier isomère change de configuration beaucoup plus lentement que l'isomère cis, mais il conduit au même état d'équilibre. De plus le phytoène trans est beaucoup plus stable que l'isomère cis lors de l'irradiation ultraviolette effectuée en présence de faibles quantités d'iode (1 à 2 % de la quantité de phytoène dans l'éther de pétrole) ce qui a été récemment confirmé (91).

II - ETUDE PHOTOCHEMIQUE DU MECANISME D'ISOMERISATION DU PHYTOENE

Afin d'élucider le mécanisme de la photoisomérisation du phytoène cis naturel, les travaux antérieurs de HAMMOND (92) sur les transferts d'énergie des cétones à des composés insaturés, nous ont permis d'envisager l'hypothèse d'un transfert d'énergie triplet-triplet de la 9-fluorénone au phytoène cis. Si la durée de vie ($3 \cdot 10^{-4}$ sec. à 25°C) et la valeur énergétique de l'état triplet de la 9-fluorénone, mesurée au maximum de la bande 0-0 de phosphorescence à -196°C ($E_T = 55,3 \text{ Kcal mole}^{-1}$), sont connues (93), il n'en est pas de même pour le phytoène. En effet, le précurseur des caroténoïdes, n'a pas donné lieu, jusqu'ici, à des travaux de photochimie. C'est pourquoi,

nous avons abordé l'étude des espèces transitoires des isomères cis et trans du phytoène à l'aide des spectres de fluorescence et de phosphorescence de ces composés à -196°C dans le méthylcyclohexane.

A - Spectres électroniques du phytoène à basse température

Avant d'aborder les états métastables des isomères du phytoène, nous avons tracé les spectres d'absorption de ces composés à la température de l'azote liquide. Chaque isomère dissous dans le méthylcyclohexane a été introduit dans une cellule en quartz SUPRASIL de 0,075 mm d'épaisseur.

Dans les mêmes conditions, nous avons également tracé le spectre du neurosporène, caroténoïde aliphatique contenant neuf doubles liaisons conjuguées, afin d'étudier l'influence de l'insaturation sur les déplacements spectraux de telles molécules. Le spectre du neurosporène possède dans le domaine visible trois maxima d'absorption à 412, 436,5 et 464 nm, la bande centrale possédant l'extinction la plus élevée. Ces maxima représentent la structure vibrationnelle fine superposée à une bande d'absorption large qui correspond à la transition électronique de l'état fondamental au premier état excité. En refroidissant, à la température de l'azote liquide, les précédents maxima d'absorption du spectre se déplacent à 436,5, 463 et 496,5 nm et la structure fine est accentuée.

Dès 1935, HAUSSER (94) avait déjà noté de tels changements spectraux avec différents diphenylpolyènes. Ces déplacements bathochromiques sont l'expression de l'abaissement de l'énergie de transition entre l'état fondamental et le premier état excité. On peut supposer qu'à très basse température en solvant rigide, la molécule est sujette à moins de déformations et qu'elle peut maintenir sa conformation plane et étendue. De plus, la conjugaison de la molécule serait meilleure à basse température qu'à la température ordinaire, en raison d'une augmentation de l'énergie de résonance et de l'abaissement de l'énergie de l'état fondamental aussi bien que du premier état excité (95).

Ainsi, le pic d'absorption, situé à la longueur d'onde la plus élevée, mesure l'écart énergétique ΔE qui correspond à la transition 0-0 (transition entre l'état fondamental et le premier état excité). Dans le

cas du neurosporène, ce pic se situe à 464 nm à 25°C, tandis qu'il est à 496,5 nm à -196°C. Ceci correspond respectivement à $\Delta E_{25^\circ\text{C}} = 61,5 \text{ kcal.mole}^{-1}$ et $\Delta E_{-196^\circ\text{C}} = 57,5 \text{ kcal.mole}^{-1}$, d'après la relation $\Delta E = Nhc/\lambda = 2,8591 \times 10^4/\lambda$.

Nous donnons ci-dessous la valeur des différentes constantes utilisées :

N nombre d'Avogadro = $6,023 \cdot 10^{23}$
 h constante de Planck = $6,625 \cdot 10^{-27} \text{ ergs.quantum}^{-1}$
 C vitesse de la lumière = $2,998 \cdot 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$
 λ longueur d'onde en nm
 $\Delta E \text{ kcal.mole}^{-1}$

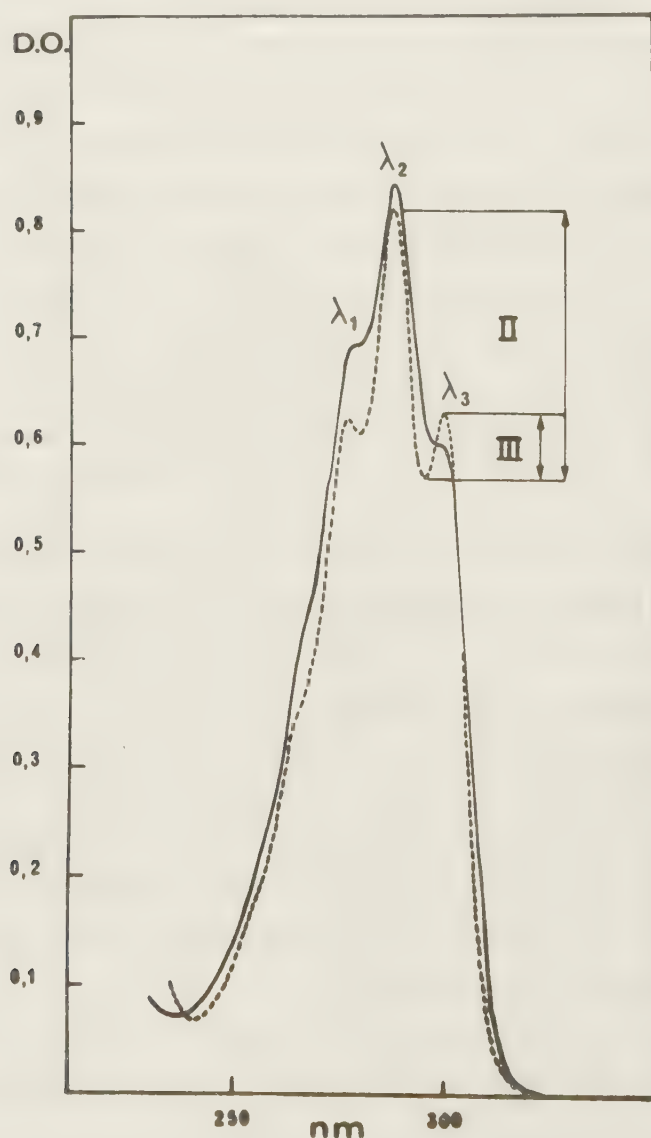


Figure 7 : Principales caractéristiques d'absorption ultraviolette des isomères cis et trans du phytoène dans le méthylcyclohexane à 25°C

Nous avons observé dans le cas du phytoène que l'effet bathochromique consécutif à l'abaissement de température est beaucoup moins marqué que pour le neurosporène, conséquence de la plus faible insaturation de la molécule de phytoène.

TABLEAU 12

Influence de la température sur les spectres d'absorption des isomères cis et trans du phytoène, dans le méthylcyclohexane

Composé	Température °C	λ maxima d'absorption	% III/II
Phytoène cis	25	276,5 - 287,5 - 300	—
Phytoène cis	- 196	267,5 - 278 - 290 - 303,5	37
Phytoène trans	25	277 - 287,5 - 300	34
Phytoène trans	- 196	266 - 276 - 289,5 - 303	58

La structure spectrale est exprimée à l'aide du rapport (% III/II) illustré dans la figure 7 (37)

De plus, d'après les déplacements spectraux des isomères cis et trans du phytoène indiqués dans le tableau 12, l'énergie de transition ΔE est égale à $95,1 \text{ kcal.mole}^{-1}$ à 25°C tandis qu'elle est voisine de $94 \text{ kcal.mole}^{-1}$ à -196°C .

De telles constatations sont en accord avec les données de la littérature. Toutefois dans le domaine des caroténoïdes, seuls les pigments fortement conjugués comme le lycopène et le β carotène avaient été étudiés jusqu'ici à basse température (96).

B - Etude de l'état singulet du phytoène

Le rendement de fluorescence semble être inversement proportionnel à la longueur de la chaîne conjuguée (97) et d'après certains travaux antérieurs (98), les caroténoïdes très insaturés ne donneraient pas lieu à un phénomène de fluorescence. On pouvait donc s'attendre à ce que le phytoène, comme le phytofluène, présente un phénomène de fluorescence.

Nous avons d'abord examiné la fluorescence du phytofluène, caroténoïde possédant cinq doubles liaisons conjuguées et qui présente, lorsqu'il est excité par une lumière de longueur d'onde convenable, un important phénomène d'émission.

Cette molécule présente, dans l'éther de pétrole et à la température ambiante, les maxima d'absorption à 332, 348 et 368 nm. Par excitation à 360 nm et à -196°C , le spectre de fluorescence présente des maxima situés à 430, 457, 487 et 520 nm. En se plaçant à 487 nm à la détection, le spectre d'excitation de fluorescence montre en revanche les maxima à 323, 340, 356 et 377 nm, ce qui est en parfait accord avec les propriétés d'absorption de cette molécule à basse température. (Figure 8).

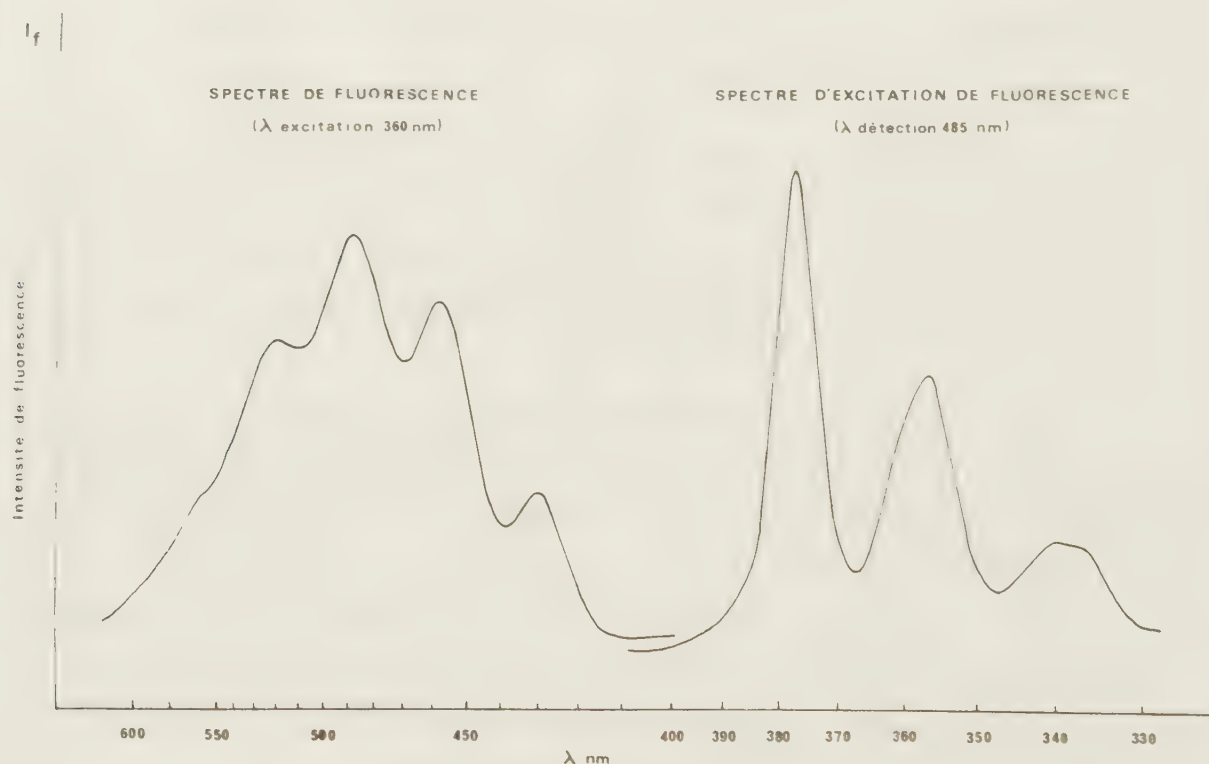


Figure 8 : Spectre d'émission et d'excitation de fluorescence du phytofluène

Nous avons également réalisé les mêmes expériences avec les isomères cis et trans du phytoène et la figure 9 reproduit les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence de ces isomères.

L'isomère cis et l'isomère trans sont excités à 285 nm et la longueur d'onde utilisée à la détection est de 350 nm dans les deux cas.

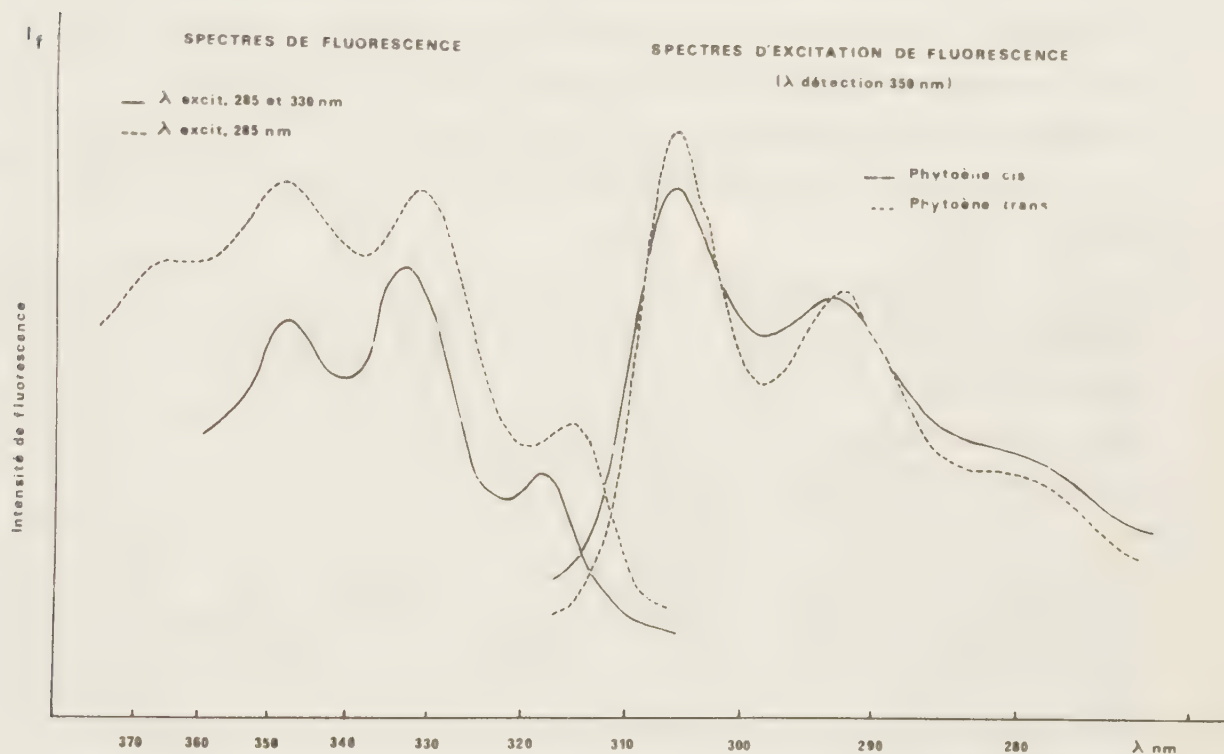


Figure 9 : Spectres d'émission et d'excitation de fluorescence des isomères cis et trans du phytoène

Les spectres d'excitation renseignent sur l'efficacité relative des diverses fréquences lumineuses excitatrices de la fluorescence (ou de la phosphorescence) et permettent, sinon de connaître le spectre d'absorption des substances responsables du phénomène du moins d'éliminer la contribution des substances qui n'absorbent pas dans les régions spectrales efficaces pour l'excitation, dans le cas d'émissions superposées. Si le rendement quantique était indépendant de la fréquence lumineuse excitatrice, les spectres d'excitation coïncideraient avec les spectres d'absorption de la substance. En fait, les voies de désexcitation non radiatives sont d'autant plus nombreuses que la fréquence excitatrice est plus élevée et on peut avoir à en tenir compte dans l'interprétation des spectres d'absorption (97).

Si l'interprétation des spectres d'excitation de la fraction phytoène cis semble relativement aisée, il n'en est pas de même pour la

fraction phytoène trans. En effet, l'isomère cis présente des spectres de fluorescence semblables lorsque la longueur d'onde d'excitation passe de 285 à 330 nm, tandis que l'isomère trans fournit deux types de spectres de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation. De plus, les spectres d'excitation de fluorescence du phytoène cis sont en accord avec l'absorption de ce composé à basse température. En revanche, lorsque la longueur d'onde utilisée à la détection varie, les spectres d'excitation de fluorescence du composé trans présentent d'autres maxima que ceux normalement attendus.

Il faut donc admettre que la fraction phytoène trans comprend en majeure partie l'isomère all trans, responsable des maxima de fluorescence à 314,5, 330 et 346,5 nm. Mais lorsque la longueur d'onde d'excitation est supérieure à 330 nm, une substance de nature inconnue est responsable des maxima observés à 371, 394 et 416 nm et son absorption ultraviolette devrait être comprise entre 325 et 340 nm. Cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle absorption lors de la réalisation des spectres électroniques de cette fraction à la température de l'azote liquide. Il est à noter que de telles ambiguïtés ont déjà été signalées pour d'autres caroténoïdes tels que le lycopène (100) et le β carotène (99) pour lesquels les auteurs ont envisagé l'intervention d'impuretés et de produits de photodégradation dans les phénomènes de luminescence.

C - Etude de l'état triplet du phytoène

Il existe plusieurs types de transfert d'énergie selon la distance qui sépare la molécule de donneur D et celle de l'accepteur A. Si les deux molécules se rapprochent suffisamment pour qu'il y ait inter-pénétration des nuages électroniques, un électron de D peut apparaître sur A. Un tel transfert d'énergie par mécanisme d'échange rend possible le très important transfert d'énergie triplet-triplet qui répond à l'équation :



De plus les vitesses de transfert d'énergie dépendent de la différence d'énergie entre le triplet du donneur et celui de l'accepteur.

Enfin la longue durée de vie de l'état triplet est particulièrement favorable à la réalisation de nombreuses réactions photochimiques (92). Puisque les réactions photosensibilisées font souvent intervenir un transfert d'énergie triplet-triplet, il est particulièrement important d'évaluer la valeur énergétique du plus bas état triplet excité du phytoène afin de tenter d'élucider le mécanisme de photoisomérisation précédemment mis en évidence. Pour cela nous avons étudié les spectres de phosphorescence des isomères du phytoène à -196°C dans le méthylcyclohexane.

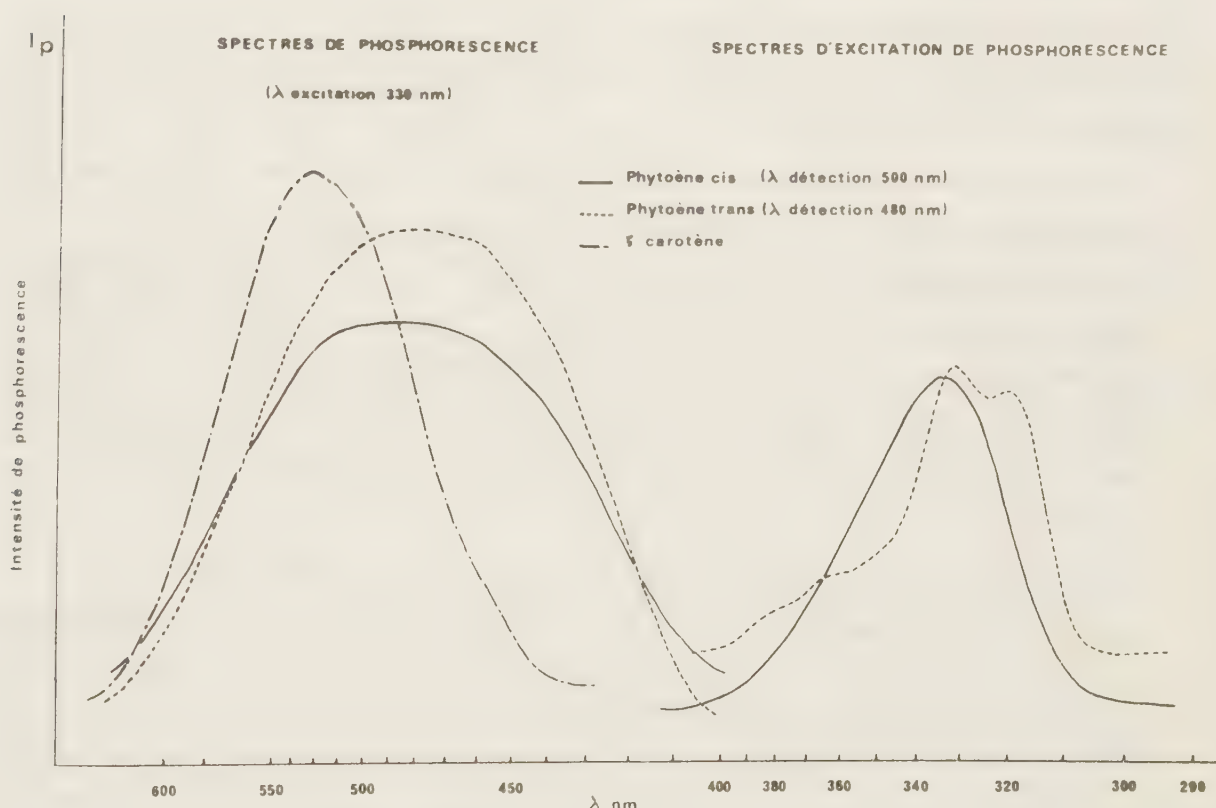


Figure 10 : Spectres d'émission et d'excitation de phosphorescence des isomères cis et trans du phytoène et spectre d'émission de phosphorescence du ζ carotène

Par excitation directe à 330 nm le phytoène cis montre un maximum vers 490 nm tandis que le phytoène trans possède un maximum vers 470 nm (figure 10). La bande 0-0 de phosphorescence, c'est-à-dire celle située à la plus courte longueur d'onde, fournira une mesure

expérimentale de l'énergie de l'état triplet. Celle-ci se calcule d'après l'équation ci-dessous :

$$E \text{ kcal.mole}^{-1} = \frac{Nhc}{\lambda} = \frac{2,8591 \times 10^4}{\lambda}$$

Ainsi dans le cas du phytoène, la valeur énergétique de l'état triplet est voisine de $70 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour les deux isomères. Cette énergie est nettement supérieure à la valeur obtenue par EVANS (101) à partir de diènes et d'hexatriènes dont les transitions singulet-triplet ont été étudiées après perturbation à l'aide de fortes pressions d'oxygène. En effet, l'énergie du triplet $E_{T_1} \leftarrow S_0$ serait estimée à $46,5 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour un système triénique. La valeur énergétique absolue du plus bas état triplet excité du phytoène est donc très supérieure aux énergies des triplets du lycopène (100), du β carotène (102) et de la chlorophylle a (103) qui sont voisines de $29 \text{ kcal.mole}^{-1}$. Toutefois CHERRY (99) indique également un état triplet égal à $48,7 \text{ kcal.mole}^{-1}$ pour le β carotène, à l'aide de mesures de fluorescence retardée. Il est utile de rappeler ici que la valeur énergétique de l'état singulet de l'oxygène est égale à $22 \text{ kcal.mole}^{-1}$.

Nous avons également obtenu, par excitation directe du ζ carotène à 330 nm et à -196°C , une émission de phosphorescence présentant un maximum vers 520 nm et le calcul montre que l'énergie du triplet de cet heptaène est voisine de $62 \text{ kcal.mole}^{-1}$. Bien que cette valeur soit supérieure à celle que l'on pouvait prévoir, elle fournit, comparée à celle obtenue pour le phytoène, un écart parfaitement compatible avec les prévisions théoriques (104). Enfin, comme dans le cas de la fluorescence, le spectre d'excitation de phosphorescence du phytoène trans est plus complexe que celui du phytoène cis.

Afin de confronter les résultats obtenus par excitation directe du phytoène avec d'autres techniques, nous avons voulu peupler l'état triplet de cette molécule par transfert d'énergie à l'aide de donneurs fortement énergétiques. C'est pourquoi nous avons utilisé les cétones suivantes : 9-fluorénone, benzophénone, acétophénone, biacétyl et acétone dont les plus bas états triplets excités ont respectivement les énergies E_T égales à 55,3, 68, 74, 55 et $72 \text{ kcal.mole}^{-1}$ (92).

Seules les phosphorescences de l'acétone et du biacétyle ont été inhibées par le phytoène. La phosphorescence des autres photosensibilisateurs n'est pas inhibée, ce qui s'expliquerait peut-être à partir de la mauvaise miscibilité de certaines molécules dans le méthylcyclohexane ; l'interpénétration des nuages électroniques entre donneur et accepteur pouvant être insuffisante pour un transfert énergétique efficace. De plus, la trop faible durée de vie de l'état triplet de certains donneurs excités pourrait rendre également ce transfert difficile.

Par ailleurs, l'addition d'atomes lourds au milieu réactionnel permet d'augmenter la probabilité de conversion intersystème, ce qui favorise la phosphorescence au détriment de la fluorescence (105). Nous avons utilisé cette méthode afin de vérifier que la phosphorescence précédemment étudiée est due à la même espèce moléculaire.

Après addition d'iodure de méthyle nous avons obtenu pour les deux isomères du phytoène, le même accroissement de la phosphorescence qui est environ cinq fois supérieure au phénomène normal et aucun déplacement spectral n'a été enregistré. Ce résultat, joint à ceux concernant l'inhibition de phosphorescence du biacétyle et de l'acétone, montre que le phénomène étudié provient bien de la même espèce moléculaire.

D - Mesure de la durée de vie moyenne de l'état triplet du phytoène

Dans une dernière série d'expériences, nous avons essayé d'évaluer la durée de vie moyenne de l'état triplet précédemment mis en évidence.

La décroissance de l'intensité de la phosphorescence est exprimée par la relation :

$$I = I_0 e^{-t/\tau} \quad \text{avec } I = \text{intensité de la phosphorescence au temps } t$$

I_0 = intensité maximum de phosphorescence pendant l'excitation

t = temps après la fin de l'excitation

τ = durée de vie moyenne de l'état excité

τ représente le temps nécessaire pour que l'intensité de phosphorescence soit égale à $1/e$ de sa valeur initiale.

Le tableau 13 rassemble les résultats obtenus dans la détermination des durées de vie moyennes de l'état triplet des fractions phytoène cis et phytoène trans, la longueur d'onde d'excitation étant de 325 nm.

TABLEAU 13

Evaluation des durées de vie moyennes
des états triplets des isomères du phytoène
en absence et en présence d'iodure de méthyle

Composé	Conditions	τ en sec.
Phytoène cis	sans I CH ₃	2,75
Phytoène cis	avec I CH ₃	0,20
Phytoène trans	sans I CH ₃	1,40
Phytoène trans	avec I CH ₃	0,08

En présence d'atome lourd, les courbes de décroissance d'émission ne sont pas exponentielles et en conséquence, on ne peut pas attribuer, d'après la phosphorescence, une valeur unique à la durée de vie de l'état triplet (106). Les résultats exprimés dans le tableau précédent n'ont donc qu'une valeur indicative. En général, la durée de vie de l'état triplet d'une molécule peut s'exprimer par la relation :

$$\tau = 1/k_p + k_{pq} \quad \text{avec } k_p = \text{constante de temps pour la décroissance radiative}$$

$$k_{pq} = \text{somme des constantes de temps pour tous les processus non radiatifs.}$$

Il semble que l'effet d'atome lourd externe soit plus important sur les transitions radiatives $T_1 \leftarrow S_0$ que sur la décroissance non radiative $T_1 \leftarrow S_0$, ce qui expliquerait la forte diminution de τ en présence de I CH₃ (107).

L'étude des états excités des polyènes conjugués, tels que les caroténoïdes et le rétinol, est particulièrement utile pour élucider les phénomènes d'isomérisation impliqués dans la photosynthèse et dans la vision.

Dans le cas des caroténoïdes, l'expérimentation est particulièrement délicate en raison du faible rendement des phénomènes d'émission de luminescence et ceci explique le caractère souvent contradictoire des résultats obtenus (108). Même si la désexcitation vibrationnelle est très rapide chez ces molécules, on comprend mal pourquoi elle aboutit beaucoup plus souvent à l'état fondamental plutôt qu'à l'état triplet. Une explication a toutefois été suggérée en invoquant une inversion par rapport à la règle de HUND, c'est-à-dire que l'énergie de l'état triplet serait supérieure, dans ce cas, au premier niveau singulet S_1 excité (109).

Nos résultats, concernant le phytoène, sont donc à rapprocher des travaux de CHERRY (99) qui a obtenu avec le β carotène une fluorescence de courte durée et une phosphorescence atteignant 4 secondes en milieu rigide et à -196°C . En fait, les phénomènes de phosphorescence, obtenus par excitation directe des caroténoïdes, restent encore mal expliqués et les auteurs ont coutume de faire intervenir la présence d'impuretés ou de produits de photodégradation (110). Il n'est pas exclus qu'il en soit de même dans le cas du phytoène, bien que cette molécule n'ait encore fait l'objet d'aucune recherche photochimique. Pour lever le doute, il sera nécessaire de confronter nos résultats concernant l'état triplet du phytoène, avec ceux qui seront obtenus à l'aide d'autres techniques plus difficilement accessibles, telles que la spectrophotométrie d'absorption par excitation éclair et la radiolyse pulsée. Contrairement à la spectroscopie éclair, la radiolyse pulsée a permis d'observer l'absorption triplet-triplet du β carotène et du lycopène, sans l'intervention de sensibilisateur, en raison de la production des états triplets par des mécanismes qui n'impliquent pas la conversion intersystème à partir des états singulets excités (111).

Pour expliquer l'isomérisation cis-trans du phytoène photo-sensibilisée par la 9-fluorénone, il faudrait peut être faire intervenir, comme dans le cas du stilbène, (112) l'existence d'un triplet "fantôme" du phytoène. L'énergie de ce triplet serait inférieure à celle des isomères cis et trans du phytoène et sa géométrie serait intermédiaire entre celle

de ces deux composés. Ainsi HAMMOND a constaté expérimentalement que la transition non verticale cis stilbène $\longrightarrow$ triplet "fantôme", nécessite moins d'énergie que la transition verticale trans stilbène $\longrightarrow$ triplet "fantôme". Bien que les valeurs énergétiques des états triplets soient souvent connues avec une certaine imprécision, l'écart énergétique entre $E_{\text{triplet plan}}$ et $E_{\text{triplet "fantôme"}}$ peut atteindre dans certains cas des valeurs relativement importantes.

CHAPITRE V

*ETUDE DE LA CAROTENOGENESE APRES ELIMINATION DU 2-HYDROXYBIPHENYLE
ET INFLUENCE DE CET INHIBITEUR SUR L'ACTIVITE RESPIRATOIRE*

Les bactéries, dont la caroténogénèse a été inhibée par le 2-OHBP, possèdent des quantités importantes de phytoène et de phytofluène. Elles représentent de ce fait un matériel particulièrement approprié à l'étude de la formation des caroténoïdes insaturés à partir des précurseurs accumulés.

De nombreuses expériences de ce type ont déjà été réalisées par différents auteurs (70, 71) mais à notre connaissance elles n'ont jamais porté sur l'évolution des isomères cis et trans des précurseurs incolores.

I - COMPOSITION EN CAROTENOIDES DES BACTERIES AVANT LEVEE D'INHIBITION

Nous avons examiné plus particulièrement la composition en isomères des précurseurs des caroténoïdes. Cette étude a été effectuée chez *Rps. spheroides*, *Rh. rubrum* et chez le mutant JV après développement en anaérobiose à la lumière et en présence de 165 μ M de 2-OHBP.

TABLEAU 14

Influence des conditions de culture sur les caroténoïdes synthétisés en présence de 2-hydroxybiphényle

Essai	Bactérie	Phase gazeuse	Durée en heures	Phytoène cis	Phytoène trans	Phytofluène cis	Phytofluène trans	̢ carotène	Autres caroténoïdes	Total
A	<i>Rps. sph</i>	N ₂	72	1900	200	350	1000	340	70	3860
B	<i>Rps. sph</i>	H ₂	72	2200	330	600	1800	550	110	5590
C	<i>Rps. sph</i>	N ₂ /CO ₂	72	1150	160	330	1300	500	traces	3440
D	<i>Rps. sph</i>	N ₂ /CO ₂	84	1800	200	400	2700	1000	100	6200
E	<i>Rps. sph</i>	N ₂ /CO ₂	96	2450	930	530	2110	470	100	6590
F	Mutant JV	N ₂ /CO ₂	96	400	350	500	1800	1250	1000	5300
G	<i>Rh. rubrum</i>	N ₂ /CO ₂	72	1810	170	50	170	100	170	2470
H	<i>Rh. rubrum</i>	N ₂ /CO ₂	84	1600	240	20	150	150	270	2430

Les quantités sont exprimées en μ g/g de matière sèche.

Il est à noter que la quantité relative de phytoène accumulée est particulièrement élevée chez *Rh. rubrum*. La synthèse des caroténoïdes fortement insaturés est certainement encore plus faible que les valeurs données dans le tableau 14 ne le laissent prévoir. En effet, si les cellules servant à l'inoculum sont dépourvues de phytoène et de phytofluène, elles contiennent, en revanche, une quantité élevée de caroténoïdes colorés qui fausse par excès la détermination de ces derniers au moment de la récolte.

II - COMPOSITION EN CAROTENOIDES DES BACTERIES APRES LEVEE D'INHIBITION

Pour effectuer la levée d'inhibition, les cellules, obtenues à partir de cultures réalisées en présence de 2-OHBP, ont été débarrassées de l'inhibiteur par plusieurs lavages à l'aide d'un tampon phosphate de potassium 10^{-2} M, pH 7,5, puis remises en suspension dans la même solution. Les incubations ont été faites, soit sous azote pur à la lumière, soit en aérobiose à l'obscurité, pendant des temps variables. Les résultats correspondant aux différentes expériences sont rassemblés dans le tableau 15. La composition initiale en caroténoïdes des bactéries cultivées en présence de 2-OHBP et ayant servi à ces expériences est indiquée dans le tableau précédent.

TABLEAU 15

Evolution des caroténoïdes après levée d'inhibition de la caroténogénèse

Essai	Bactérie	Conditions	Durée en heures	Phytoène cis	Phytoène trans	Phytofluène cis	Phytofluène trans	% carotène	Autres caroténoïdes	Total
C ₁	<i>Rps.sph</i>	N ₂ lumière	4	850	180	200	1600	500	traces	3310
C ₂	<i>Rps.sph</i>	Air obscurité	4	270	180	320	1900	600	250	3500
B ₁	<i>Rps.sph</i>	N ₂ lumière	20	700	300	250	1200	510	350	3310
F ₁	Mutant J V	N ₂ lumière	48	180	340	100	475	400	400	1875
G ₁	<i>Rh.rubrum</i>	N ₂ lumière	48	800	150	10	35	50	1600	2645
H ₁	<i>Rh.rubrum</i>	Air obscurité	48	1000	200	traces	40	60	2000	3300

Les quantités sont exprimées en µg/g de matière sèche.

Malgré la difficulté d'établir un bilan, certaines remarques peuvent être avancées : chez *Rh. rubrum*, le taux de phytoène reste relativement élevé mais les caroténoïdes insaturés représentent environ 60 % des pigments totaux. En anaérobiose à la lumière, la perte en caroténoïdes est faible et la somme des polyènes synthétisés de novo est sensiblement égale à la somme de ceux qui ont disparu. En aérobiose, on assiste à une augmentation très importante de la quantité totale des pigments, ce qui laisse supposer que des réserves endogènes, autres que le phytoène, et non transformables en anaérobiose-lumière, ont été ici métabolisées.

Chez *Rps. spheroides*, on note surtout une destruction très importante du phytoène et du phytofluène. De plus, il semble que malgré plusieurs lavages, l'inhibition de la caroténogénèse n'ait pas pu être levée complètement par suite peut-être d'une fixation intracellulaire du 2-OHBP beaucoup plus efficace que chez *Rh. rubrum*.

Nous avons alors tenté de supprimer l'action de l'inhibiteur sans avoir recours à des lavages. En raison de la forte inhibition de croissance, provoquée par le 2-OHBP en aérobiose, nous n'avons pas pu observer l'action de cet inhibiteur sur la caroténogénèse dans ces conditions. Cependant il n'est pas interdit de penser que son action sur la désaturation du phytoène, soit moins forte qu'en anaérobiose.

Nous avons tout d'abord cultivé, pendant 48 heures, *Rh. rubrum*, en anaérobiose à la lumière en présence de 165 μM d'inhibiteur afin d'obtenir une accumulation des précurseurs saturés, puis cette culture a été placée pendant 48 heures en aérobiose à l'obscurité.

Les résultats obtenus montrent que la désaturation du phytoène est toujours fortement freinée et que celui-ci représente encore 75 % environ de l'ensemble des caroténoïdes. Toutefois, bien que l'inhibiteur reste actif même à l'obscurité en présence d'air, une synthèse de phytoène est intervenue pendant la phase obscure. En effet, la quantité de phytoène atteint 3,4 mg/g (bactéries sèches) ce qui est une valeur particulièrement élevée.

Par ailleurs SISTROM (113) a remarqué que chez le mutant GA de Rps. spheroides une forte tension en oxygène stoppe la synthèse pigmentaire sans détruire les pigments préexistants. Le contenu en bactériochlorophylle et caroténoïdes de ces bactéries, cultivées ensuite dans des conditions normales, peut alors augmenter en raison de la reprise de la synthèse protéique.

Si l'on suppose que le 2-OHBP réprime la biosynthèse des enzymes impliquées dans la désaturation des caroténoïdes, l'addition de chloramphénicol, au moment du retrait du 2-OHBP, devrait interdire la formation des caroténoïdes colorés aux dépens des précurseurs saturés, puisque cet antibiotique inhibe la synthèse protéique chez les bactéries.

Au contraire, si l'on suppose que le 2-OHBP inhibe l'activité des enzymes préformés impliqués dans ces réactions, l'addition de chloramphénicol, après le retrait du 2-OHBP, ne devrait exercer aucune action.

Dans un premier temps nous avons donc cultivé Rh. rubrum pendant 72 heures en anaérobiose à la lumière en présence de 2-OHBP afin d'obtenir une accumulation importante de phytoène. Après élimination de l'inhibiteur de la caroténogénèse, les bactéries sont mises en suspension dans une solution de tampon phosphate de potassium 10^{-2} M pH 7,5. On ajoute alors 60 μ M de chloramphénicol et on place la suspension à 30°C en aérobiose à l'obscurité pendant 48 heures.

Les résultats de ces expériences sont mentionnés dans le tableau 16.

Après la levée d'inhibition, en absence de chloramphénicol, le phytoène et le phytofluène ne représentent plus que 30 % des caroténoïdes totaux. De plus, il faut souligner la quantité importante de rhodovibrine et de spirilloxanthine, qui montre que la levée d'inhibition est bien totale. Par ailleurs, nous assistons également à une perte pigmentaire non négligeable, comme nous l'avons déjà constatée précédemment (tableau 15).

Après la levée d'inhibition, en présence de chloramphénicol, le phytoène et le phytofluène représentent encore près de 62 % de l'ensemble des pigments. La quantité de caroténoïdes fortement insaturés est faible d'autant plus qu'il y a eu perte pigmentaire à ce niveau. De plus, la levée d'inhibition est incomplète dans ce cas et, malgré une synthèse endogène de phytoène nous assistons à un blocage au niveau du lycopène.

TABLEAU 16

Influence du chloramphénicol sur la formation des caroténoïdes pendant la levée d'inhibition de la caroténogenèse

Caroténoïdes	ESSAIS		
	A	B	C
Phytoène	1970	390	1200
Phytofluène	60	200	184
ζ carotène	10	45	40
Lycopène	40	415	750
Rhodovibrine } Spirilloxanthine }	85	800	40
Total	2165	1850	2214

A = Témoin avant levée d'inhibition

B = Témoin après levée d'inhibition

C = Essai de levée d'inhibition en présence de 20 µM de chloramphénicol.

Les résultats de l'essai C sont nettement différents de ceux de l'essai B, ce qui est en faveur d'une action exercée par le chloramphénicol. Nous distinguerons d'une part la désaturation du phytoène d'autre part celle du lycopène. Malgré la présence de chloramphénicol, il y a abaissement du taux de phytoène mais celui-ci reste anormalement élevé. Si ce résultat était dû à une répression, par le 2-OHBP, de la biosynthèse des enzymes de désaturation, celle-ci serait donc incomplète. A ce niveau de transformation, on pourrait également envisager une simple inhibition. Dans ce cas, le taux relativement élevé du phytoène (essai C) pourrait s'expliquer par une rétroinhibition due aux fortes quantités de lycopène.

En outre, en présence de chloramphénicol, nous n'assistons pas au métabolisme du lycopène. Il y aurait donc répression, par le 2-OHBP, de la biosynthèse des enzymes responsables de sa transformation. Au contraire, dans l'essai B, ces enzymes sont synthétisés et la levée d'inhibition est complète.

- Une synthèse endogène de phytoène a été également constatée chez *Rh. rubrum* (70) et *Flavobacterium dehydrogenans* (114) lors de levées d'inhibition après cultures en présence de DPA. De plus, pour expliquer la transformation relativement faible du phytoène, après élimination de l'inhibiteur, on peut penser que le phytoène accumulé au cours de l'inhibition possède une localisation cellulaire inhabituelle qui le rend inaccessible à l'action enzymatique. Cependant nous montrerons dans le chapitre suivant que la majorité du phytoène se trouve localisée dans les chromatophores ce qui est en accord avec les résultats déjà publiés (70).

Par ailleurs, les caroténoïdes pourraient exister d'une part, sous une forme fonctionnelle, la seule compatible avec leur transformation, d'autre part, sous une forme de stockage métaboliquement inerte. Certains auteurs ont suggéré que les chromatophores possèdent, pour les caroténoïdes fonctionnels, (70) un nombre limité de sites desquels se trouverait exclue la plus grande partie du phytoène au cours de son accumulation.

Ces hypothèses bien que séduisantes n'ont pas reçu jusqu'ici de confirmations expérimentales, chacune d'entre elles pourrait cependant rendre compte des difficultés rencontrées lors des levées d'inhibition.

III - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR L'ACTIVITE DE LA NADH OXYDASE

A notre connaissance, l'influence des inhibiteurs de la caroténogénèse n'a jamais été étudiée jusqu'ici sur l'activité respiratoire des systèmes membranaires des bactéries photosynthétiques.

Cependant il a déjà été montré que certains dérivés du biphenyle et en particulier les dérivés ortho et méthahydroxylés, diminuaient la respiration chez des *Mycobactéries* (115).

Dans le cas de la DPA, on a souvent pensé que ce composé devait inhiber un système de deshydrogénases et en conséquence, l'addition de coenzymes intervenant dans les deshydrogénations, tels que NADP, devrait lever l'inhibition provoquée par la DPA (116). En fait, la présence de NAD et d'ATP (à raison de deux fois la concentration molaire de DPA) entraîne certes la reprise de la synthèse du β carotène et de la croissance de Phycomyces, mais elle ne ramène pas la synthèse des polyènes plus saturés à un taux normal (116).

De son côté, SALTON (117) a montré que l'activité NADH oxydase est particulièrement intense dans la fraction membranaire de différentes bactéries, alors que la fraction contenant les parois en est dépourvue.

Le transport d'électrons, à partir de NADH ou du succinate vers l'oxydase terminale, commun aux bactéries photosynthétiques cultivées en aérobiose à l'obscurité ou en anaérobiose à la lumière, s'effectue par l'intermédiaire de flavoprotéines, d'un cytochrome b et, dans le cas de *Rh. rubrum*, d'ubiquinone associée au cytochrome b (118). Contrairement à *Rps. spheroides* qui comporte un cytochrome a en tant qu'oxydase terminale lors de conditions aérobies particulières à l'obscurité, *Rh. rubrum* posséderait une oxydase terminale de type o, probablement un cytochrome b (118).

Pour notre part, nous avons examiné l'activité NADH oxydase à partir de membranes brutes de *Rh. rubrum* préalablement cultivé en anaérobiose à la lumière, en absence de 2-OHBP. Nous avons choisi cette fraction membranaire brute car l'activité enzymatique y est plus élevée que dans les chromatophores purifiés (52). En effet, si la plus grande partie de la bactériochlorophylle est localisée dans les vésicules intracytoplasmiques, la NADH oxydase serait plus abondante dans la membrane cytoplasmique.

Nous avons donc récupéré, après deux passages des bactéries à la presse French et élimination des gros débris cellulaires, la fraction sédimentant à 220 000 g et qui représente le matériel membranaire brut. A une fraction de ce matériel membranaire a été ajoutée une faible quantité de NADH pour induire la réaction de deshydrogénation. L'activité de la NADH oxydase a été déterminée en mesurant la diminution de la densité optique à 334 nm, correspondant à l'absorption du NADH.

Dans le tableau 17, les résultats des essais A et B représentent l'activité NADH oxydase en fonction des quantités de 2-OHBP d'une part, et de suspensions membranaires d'autre part.

Dans le tableau 18, les essais C et D montrent l'influence de la concentration en inhibiteur sur l'activité NADH oxydase en fonction du temps d'incubation, pour la même quantité de membranes brutes.

TABLEAU 17

Influence du 2-hydroxybiphényle sur l'activité NADH oxydase

ESSAI A (Bchl: 171 µg/ml)

VOLUME DE L'ECHANTILLON						
2 OHBP µg/ml	0,10 ml		0,20 ml		0,40 ml	
	ΔDO _{334nm}	% d'activité	ΔDO _{334nm}	% d'activité	ΔDO _{334nm}	% d'activité
0	0,032	100	0,070	100	0,130	100
5	0,022	70	0,052	75	0,114	88
10	0,016	50	0,040	57	0,080	62
20	0,010	32	0,024	34	0,040	31
30	0,006	19	0,019	27	0,030	23
40	0,0045	14	0,010	14,3	0,020	15
50	0,0030	10	0,009	13	0,010	7,5

ESSAI B (Bchl: 50 µg/ml)

VOLUME DE L'ECHANTILLON				
2 OHBP µg/ml	0,15 ml		0,30 ml	
	ΔDO _{334nm}	% d'activité	ΔDO _{334nm}	% d'activité
0	0,027	100	0,057	100
5	0,018	67	0,038	65
10	0,016	59	0,029	51
20	0,008	30	0,020	35
30	0,006	22	0,014	25
40	0,0035	13	0,0045	8
50	0,0025	9,3	0,0020	3,5

Les mesures sont effectuées après cinq minutes d'incubation.

TABLEAU 18

Influence du 2-hydroxybiphényle sur l'activité NADH oxydase
en fonction du temps, pour une même quantité de membranes brutes

ESSAI C

Incubation (mn)	2 OHBP (µg/ml)		
	0	15	30
0	0,140	0,140	0,090
2,5	0,130	0,120	0,080
5	0,130	0,090	0,070
10	0,090	0,070	0,060
15	0,090	0,070	0,040
20	0,060	0,055	0,040
30	0,045	0,040	0,030

ESSAI D

Incubation (mn)	2 OHBP (µg/ml)				
	0	60	90	120	150
0	0,102	0,035	0,033	0,015	0,014
2,5	0,090	0,030	0,025	0,013	0,010
5	0,085	0,030	0,025	0,012	0,009
10	0,060	0,029	0,023	0,011	0,006
15	0,055	0,028	0,022	0,010	0,006
20	0,045	0,027	0,015	0,009	0,006
30	0,030	0,026	0,013	0,008	0,006

Les résultats représentent les valeurs de ΔDO mesurées à 334 nm.

La figure 11 reprend la moyenne des valeurs données dans les tableaux précédents et résume l'ensemble des résultats en mettant en évidence la décroissance exponentielle de l'activité NADH oxydase en fonction des quantités d'inhibiteur ajoutées à la suspension membranaire.

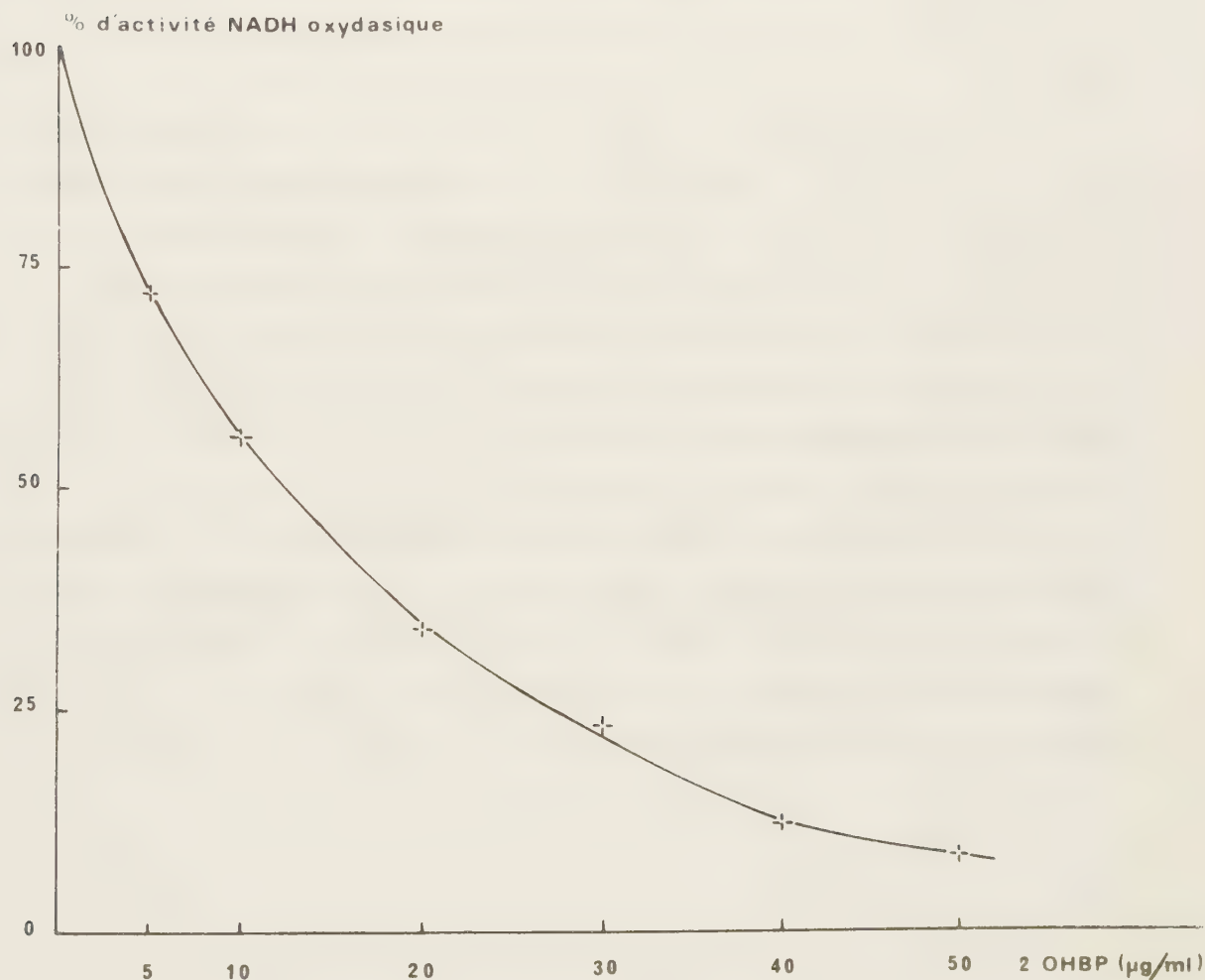


Figure 11 : Evolution de l'activité NADH oxydase en fonction des quantités de 2-hydroxybiphényle

L'ensemble de ces résultats montre la forte répression de l'activité NADH oxydase en présence de quantités relativement faibles de 2-OHBP. Ainsi nous pouvons tenter de définir une constante d'inhibition C_i pour cet inhibiteur. Cette constante correspond à la quantité de 2-OHBP

qui entraîne une réduction de 50 % de l'activité NADH oxydase observée en l'absence d'inhibiteur.

Ainsi on a pu évaluer, selon les différents cas, la valeur de C_i à environ 70 μM de 2-OHBP pour une concentration en bactériochlorophylle comprise entre 10 et 75 mg par ml . Une telle inhibition de l'activité NADH oxydasique pourrait rendre compte partiellement de la forte toxicité de cet inhibiteur vis-à-vis de la croissance bactérienne en aérobiose à l'obscurité.

Au cours de la croissance des bactéries, nous avons assisté à une accumulation de 2-OHBP dans la partie membranaire. Effectivement les membranes extraites de bactéries inhibées et lavées plusieurs fois, montrent une activité NADH oxydase nettement plus faible que celle des membranes isolées de bactéries normales. De même l'addition de l'inhibiteur à des suspensions membranaires, entraîne une répression immédiate de l'activité respiratoire de ces extraits, ce qui est en faveur d'une pénétration intra-membranaire très rapide de ce composé.

Ces résultats pourraient expliquer, en partie, les difficultés rencontrées lors des levées d'inhibition de la caroténogénèse en aérobiose. En effet, la présence de traces d'inhibiteur dans les membranes bactériennes suffit à freiner l'activité de la NADH oxydase et pourrait donc maintenir l'inhibition des désaturations des précurseurs des caroténoïdes.

CHAPITRE VI

INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA COMPOSITION
ET SUR L'EVOLUTION DU SYSTEME MEMBRANAIRE
DES BACTERIES PHOTOSYNTHETIQUES

Dans les conditions de croissance photosynthétique, tous les membres des Thiorhodacées et des Athiorhodacées possèdent des structures membranaires caractéristiques, appelées chromatophores ou thylakoïdes (119), auxquelles se trouvent associés les pigments photosynthétiques. L'origine de ces membranes intracytoplasmiques de forme et de nombre très différents, a posé de nombreux problèmes. En fait, il semble admis, actuellement, que les chromatophores représentent une différenciation de la membrane cytoplasmique elle-même.

Toutefois, ces vésicules sont absentes dans les mutants non photosynthétiques ou dans les bactéries cultivées sous forte tension en oxygène (120).

Si les travaux abondent en ce qui concerne l'influence de la formation de la bactériochlorophylle sur l'élaboration des chromatophores et leur morphogénèse (121), il n'en est pas de même pour les caroténoïdes. Bien que leur concentration intracellulaire semble proportionnelle à la quantité de bactériochlorophylle, les caroténoïdes insaturés ne sont pas indispensables à la formation des chromatophores. Ainsi, des mutants capables de se développer en anaérobiose à la lumière et dépourvus de caroténoïdes colorés, possèdent cependant des membranes intracytoplasmiques (120).

Les principaux constituants de la membrane sont de nature protéique et lipidique et la plus grande partie des lipides est représentée par les phospholipides (122). Il faut cependant noter que le type d'interaction entre les lipides et les protéines, ainsi que l'organisation des lipides au sein de la membrane ne sont pas encore clairement définis. En outre, les membranes contiennent de grandes quantités d'ubiquinones surtout lorsque les cellules sont cultivées en anaérobiose à la lumière (123). La participation de ces composés à différentes chaînes de transport d'électrons nous dispense de souligner leur importance.

Si le 2-OHBP inhibe fortement la formation des caroténoïdes colorés, la diminution de la croissance bactérienne, constatée parallèlement, nous a incités à rechercher l'influence de cet inhibiteur sur la biosynthèse de quelques substances essentielles, tant du point de vue structural que du point de vue fonctionnel. C'est pourquoi nous avons comparé le contenu en chlorophylles, en ubiquinones et en lipides, des bactéries cultivées en absence et en présence de 2-OHBP.

I - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA BIOSYNTHESE DE LA BACTERIOCHLOROPHYLLE

L'action des inhibiteurs de la caroténogenèse, en particulier celle de la DPA, a été différemment interprétée en ce qui concerne la synthèse chlorophyllienne et a donné lieu à des résultats contradictoires. En effet, GOODWIN et OSMAN (124) ont montré que cet inhibiteur diminue la synthèse des caroténoïdes en même temps que celle de la bactériochlorophylle. Au contraire, pour d'autres auteurs, cette dernière synthèse ne serait pas modifiée (125, 126).

Pour notre part, nous avons cultivé Rps. spheroides, sans inhibiteur, pendant 48 heures soit en anaérobiose à la lumière, soit en aérobiose à l'obscurité. En anaérobiose à la lumière nous avons étudié l'influence de la nature de la phase gazeuse sur la formation des pigments, et, à l'obscurité l'influence de l'augmentation de la tension en oxygène sur la synthèse de la bactériochlorophylle. Les pigments ont été extraits des bactéries par épuisement à l'aide de solvants organiques, la bactériochlorophylle a été dosée dans le mélange acétone-méthanol 7/2 et les caroténoïdes dans EP.

Comme prévu, nous constatons une forte répression des synthèses pigmentaires sous forte tension d'oxygène, mais le rapport bactériochlorophylle/caroténoïdes totaux reste cependant dans des limites relativement étroites allant de 3,7 en présence d'oxygène pur, à 4,6 dans les conditions d'anaérobiose les plus favorables à la synthèse des pigments.

Les cultures, effectuées pendant 72 heures à la lumière sous N_2-CO_2 et en présence de quantités de 2-OHBP allant de 80 à 190 μM , montrent que la valeur du rapport bactériochlorophylle/caroténoïdes passe de 4,6 à 8. Parallèlement, la valeur du pourcentage des caroténoïdes saturés (phytoène + phytofluène), par rapport aux caroténoïdes totaux, augmente en fonction des doses d'inhibiteur et se trouve comprise entre 67 et 90 %.

Bien que ces déterminations ne correspondent pas toujours au même état physiologique des bactéries dans les différents essais

TABLEAU 19

Influence des conditions de culture sur la formation
de la bactériochlorophylle et des caroténoïdes
en présence et en absence de 2-hydroxybiphényle

Durée en heures	Culture	Conditions	A	B
48	normale	N ₂ -CO ₂ lumière	4,6	0
48	normale	N ₂ lumière	4,2	0
48	normale	air obscurité	4,8	0
48	normale	O ₂ obscurité	3,7	0
72	inhibée	N ₂ -CO ₂ lumière	4,6	67
72	inhibée	N ₂ -CO ₂ lumière	5,6	75
72	inhibée	N ₂ -CO ₂ lumière	6,3	85
72	inhibée	N ₂ -CO ₂ lumière	7,0	85
72	inhibée	N ₂ -CO ₂ lumière	7,2	90
72	inhibée	H ₂ lumière	8,0	80

$$A = \frac{\text{bactériochlorophylle}}{\text{caroténoïdes totaux}}$$

$$B = \% \frac{\text{phytoène} + \text{phytofluène}}{\text{caroténoïdes totaux}}$$

(nombre de générations, quantité de pigments), le rapport bactériochlorophylle/caroténoïdes est d'autant plus important que l'inhibition de la caroténogenèse est plus sévère.

Ces résultats montrent donc que le 2-OHBP n'inhibe pas la synthèse globale de la bactériochlorophylle. Cependant, il est maintenant admis qu'il existe, chez les bactéries photosynthétiques, au moins deux types de bactériochlorophylle, distinctes sur le plan fonctionnel, et situées dans un environnement moléculaire différent (127). La plus grande partie de la bactériochlorophylle servant à capter l'énergie lumineuse se trouverait soit dans une couche lipoprotéique (128) soit dans une double couche lipidique (129), tandis que la chlorophylle du centre réactionnel serait localisée dans un site hydrophobe de certaines protéines membranaires (128). Il est cependant impossible de savoir actuellement si le 2-OHBP influence plus particulièrement l'une de ces deux synthèses, supposées indépendantes sur le plan du contrôle génétique (130).

II - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA SYNTHÈSE DES UBIQUINONES

Les ubiquinones possèdent une chaîne latérale formée de plusieurs unités isopréniques et présentent donc une certaine analogie avec les caroténoïdes. C'est pourquoi il était intéressant d'étudier l'action du 2-OHBP sur la biosynthèse de ces composés.

L'action de la DPA sur la synthèse des ménaquinones a déjà été signalée par SALTON (117) et HAMMOND (131) chez les bactéries non photosynthétiques. De même, l'influence de l'oxygène semble comparable à celle de la DPA en ce qui concerne la réduction de la synthèse des ubiquinones de *Rh. rubrum* (132). Enfin chez *Rhodotorula glutinis*, le 2-OHBP amène également une déficience en ubiquinones de l'ordre de 50 % (133).

Pour notre part, nous avons étudié l'influence du 2-OHBP sur la synthèse des ubiquinones de *Rps. spheroides*. Nous avons cultivé cette bactérie dans un milieu contenant du malate, source carbonée particulièrement favorable à la synthèse des ubiquinones chez les bactéries photosynthétiques (123). Ces cultures ont été effectuées à la lumière sous N_2-CO_2 , pendant 48 heures, en absence de 2-OHBP, ou pendant 72 heures

en présence de 165 μM d'inhibiteur. Les ubiquinones ont été extraites à l'aide de solvants organiques et chromatographiées sur colonne d'alumine acide. Elles ont été dosées après réduction de la forme quinone et mesure de la diminution d'absorption à 275 nm.

Alors que les cultures photosynthétiques normales renferment environ 5 μM d'ubiquinones par gramme (poids sec bactérien), celles effectuées en présence de 2-OHBP n'en contiennent que 2 à 2,5 μM , ce qui représente une réduction de 50 % environ.

Bien que les synthèses des caroténoïdes et des ubiquinones suivent une voie commune dans l'élaboration de la chaîne isoprénique, les enzymes nécessaires à celles-ci ne sont pas inhibés de la même manière par le 2-OHBP. En effet, puisque cet inhibiteur n'empêche pas la formation des polyènes incolores, le ralentissement de celle des quinones ne devrait pas se situer au niveau de la biosynthèse de la chaîne latérale isoprénique, mais plutôt au rattachement de celle-ci au noyau aromatique.

III - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA TENEUR EN LIPIDES DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

Il a déjà été montré que la DPA ne modifie pas le contenu lipidique total de Phycomyces blakesleanus (134) et de Rhodotorula gracilis (135). En revanche dans le cas de cultures de Rh. rubrum, âgées de plus de cinq jours, la DPA entraîne une diminution importante du contenu lipidique global (124).

Nous avons étudié chez Rh. rubrum l'influence du 2-OHBP sur la formation des différents lipides et plus particulièrement sur celle des phospholipides. Le rôle de ces lipides est essentiel dans l'élaboration des structures membranaires des bactéries photosynthétiques et leur composition varie en fonction des conditions de croissance (136). De plus, la formation des pigments photosynthétiques pourrait entraîner des changements de la structure membranaire conduisant à une incorporation accrue de phospholipides dans la membrane (122).

Les bactéries ont été cultivées en anaérobiose (N_2-CO_2) à la lumière soit pendant 48 heures en absence de 2-OHBP, soit pendant 72 heures en présence de 165 μM d'inhibiteur. Ces bactéries se trouvent, dans les deux cas, à la fin de la phase exponentielle de croissance.

Les lipides des bactéries normales et inhibées ont été extraits par épuisement à l'aide de solvants organiques et ensuite séparés en différentes classes par chromatographie sur colonne d'acide silicique.

Dans ces conditions, la quantité totale de lipides des bactéries inhibées est sensiblement la même que celle des bactéries normales et celle des phospholipides est voisine dans les deux cas. La différence la plus significative concerne la teneur en lipides neutres qui est deux fois plus élevée dans les cellules inhibées que dans les cellules normales. Les lipides neutres ne représentent toutefois jamais plus de 10 % des lipides totaux.

Les différentes fractions, obtenues après élution de la colonne d'acide silicique, ont été ensuite analysées par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Nous avons ainsi observé que la composition de la fraction la plus importante contenant les phospholipides, est semblable en présence et en absence d'inhibiteur.

Nous avons caractérisé la phosphatidylcholine, le phosphatidylglycérol, la phosphatidyléthanolamine et le diphosphatidylglycérol qui ont déjà été mis en évidence chez *Rh. rubrum* (137).

Contrairement à la mutation (122), l'inhibition de la caroténogénèse par le 2-OHBP ne semble donc modifier de façon significative ni la teneur, ni la composition en lipides des bactéries.

IV - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LES PROPRIETES ET LA NATURE DES PIGMENTS DES CHROMATOPHORES ET SUBCHROMATOPHORES DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

Bien que le 2-OHBP n'affecte pas de façon sensible la synthèse des lipides, son action sur le complexe pigmentaire au niveau du chromatophore et des subchromatophores pourrait se traduire par des

changements dans les spectres d'absorption "in vivo" des caroténoïdes et de la bactériochlorophylle. En effet, les modifications dans les associations entre les pigments photosynthétiques et certains complexes lipoprotéiques, entraînent des déplacements de plusieurs nanomètres des maxima d'absorption de la bactériochlorophylle et des caroténoïdes.

A - Préparation des chromatophores et des subchromatophores

Les bactéries ont été cultivées sous N_2-CO_2 à la lumière soit pendant 48 heures en absence de 2-OHBP (essai A), soit pendant 72 heures en présence de 110 μM (essai B) ou de 165 μM (essai C) d'inhibiteur.

Après broyage des bactéries, les chromatophores ont été isolés par centrifugations répétées pour éliminer les débris cellulaires de taille élevée. Les chromatophores bruts ont été ensuite purifiés sur colonne de Sepharose 2B et par centrifugation en gradient de saccharose pendant 5 heures à 100 000 g. Cette fraction est appelée chromatophores purs.

Par ailleurs, les chromatophores des bactéries normales ont été fractionnées par traitement au Triton X-100 (138). Les chromatophores purs précédemment isolés ont été traités pendant 3 heures en présence de 10 % de Triton X-100 (v/v) à pH neutre et à +5°C. Cette fraction a été ensuite centrifugée en gradient de saccharose pendant 15 heures à 110 000 g. Nous avons alors obtenu trois bandes distinctes, 1, 2 et 3, la bande 1 étant située à la partie supérieure du tube.

B - Spectres d'absorption des chromatophores et subchromatophores

1) Chromatophores

A partir des essais A, B et C précédents nous avons tracé, en milieu aqueux, les spectres d'absorption des chromatophores correspondants.

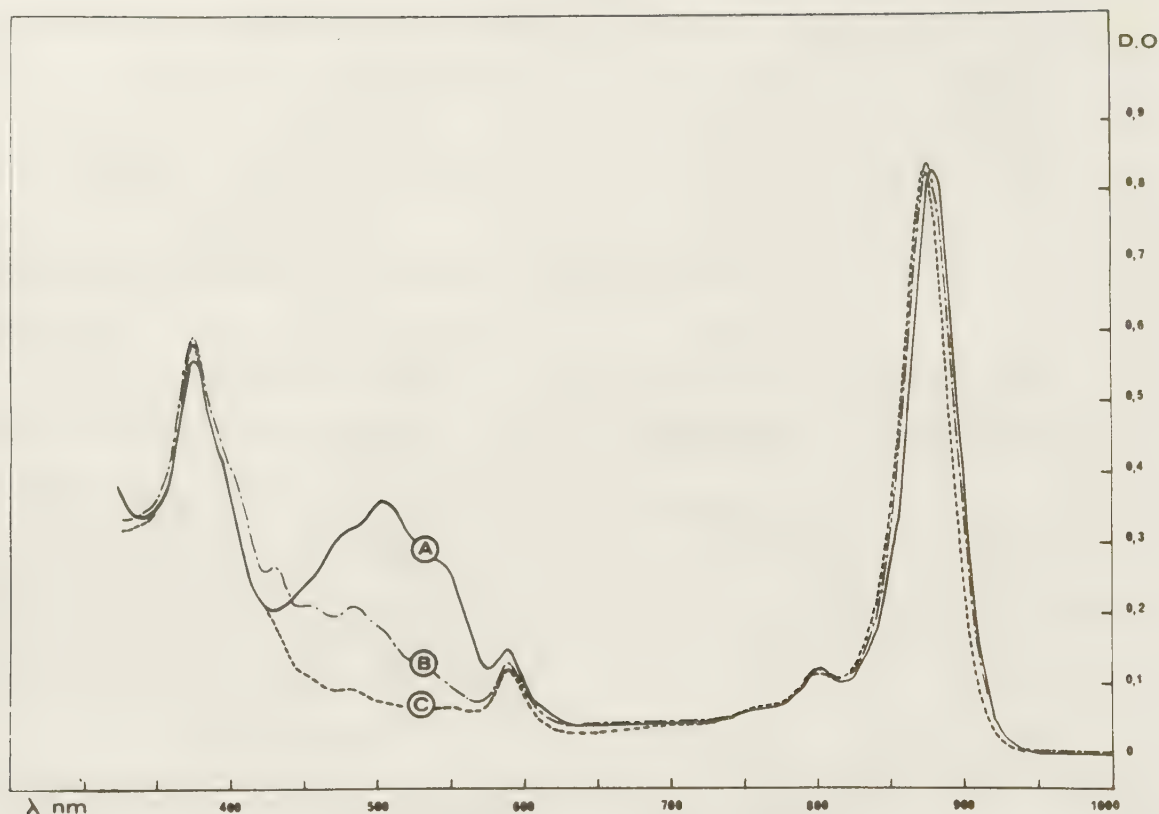


Figure 12 : Spectres d'absorption des chromatophores isolés de bactéries normales (A) et inhibées (B et C)

Il est à noter que les spectres B et C présentent, par rapport au spectre A un léger déplacement hypsochromique n'excédant jamais 5 nm.

Cette différence spectrale est cependant trop faible pour traduire une modification de l'environnement moléculaire des chlorophylles dans les bactéries inhibées. Il faut également noter la diminution de l'absorption vers 500 nm, dans les spectres B et C, due à l'absence de caroténoïdes colorés. De même la DPA n'a aucune influence sur les spectres d'absorption des chromatophores de *Rps. spheroides* (139) et *Rh. rubrum* (125). Au contraire, chez *Chromatium D*, cultivé en présence de ce même inhibiteur (140) et dans les chromatophores de certains mutants de *Rps. spheroides* (141), le spectre d'absorption in vivo des pigments photosynthétiques présente des modifications sensibles.

2) Subchromatophores

La figure 13 reproduit les spectres d'absorption des fractions 1, 2 et 3 obtenues à partir des chromatophores isolés de bactéries cultivées en absence de 2-OHBP et traités au Triton X-100.

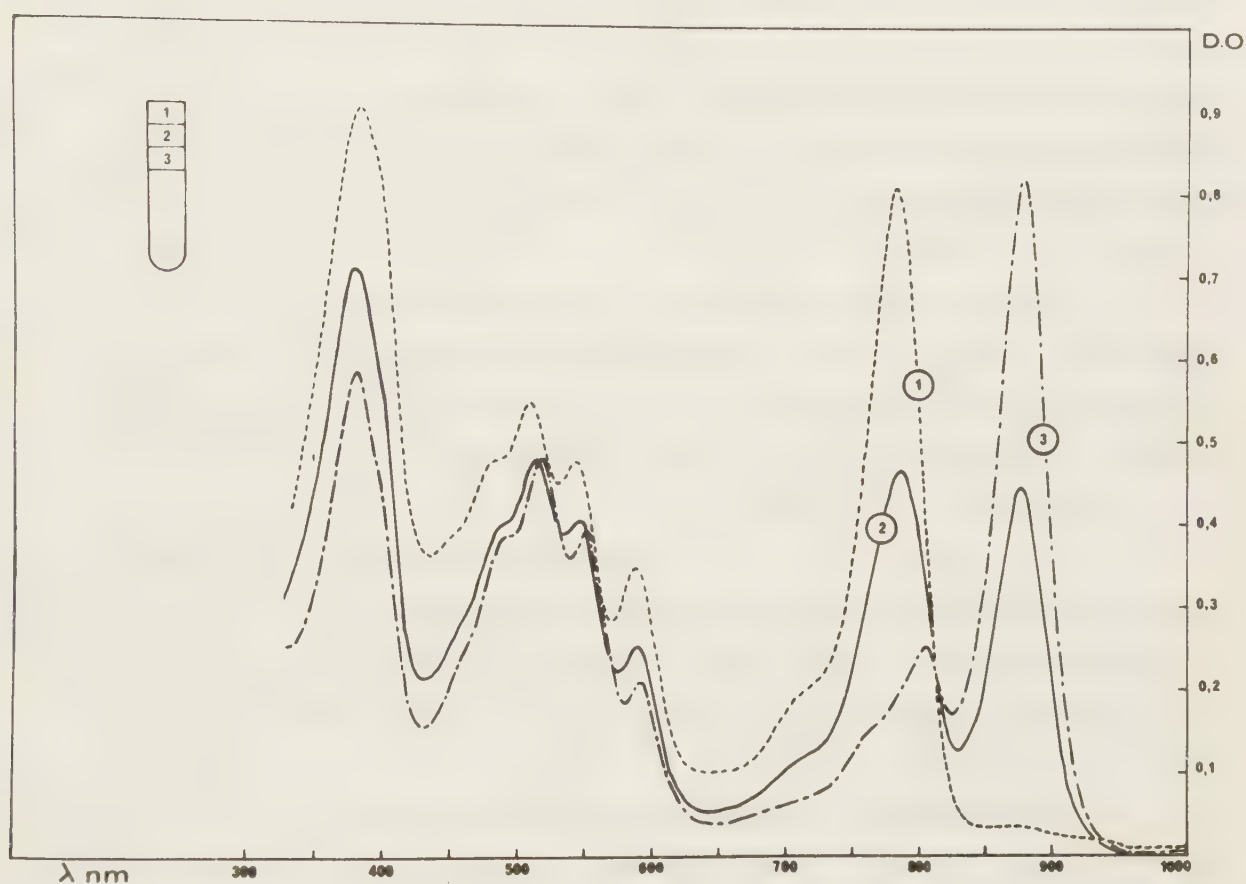


Figure 13 : Spectre d'absorption des fractions subchromatophores

Deux complexes contenant l'un les caroténoïdes, l'autre les bactériophaeophytines ont été mis en évidence après traitement des chromatophores au Triton X-100 à pH 2 (142). Dans nos conditions expérimentales, beaucoup plus douces, nous n'avons pas obtenu de distribution nette des caroténoïdes mais aucune phaeophytinisation de la bactériochlorophylle n'a été constatée, ce qui explique l'absence, dans nos spectres, de maxima situés vers 755 et 850 nm. En revanche, le traitement que nous avons utilisé nous a permis de séparer de façon très satisfaisante la bactériochlorophylle 800 de la bactériochlorophylle 880, l'une et l'autre restant associées aux caroténoïdes.

Influence du 2-hydroxybiphényle sur la composition en caroténoïdes et en bactériochlorophylle des chromatophores de *Rhodospirillum rubrum*

Dans les chromatophores le phytoène ne peut pas être mis en évidence par examen spectrophotométrique direct puisque son absorption est masquée par celle des acides nucléiques et des protéines. Il a donc été nécessaire d'extraire les pigments des chromatophores de la même façon que pour les bactéries entières. Les chromatophores qui ont été utilisés provenaient de bactéries cultivées en anaérobiose à la lumière, pendant 48 heures, en absence d'inhibiteur.

Dans ces chromatophores, nous avons dosé par milligramme de protéines, environ 23 µg de caroténoïdes insaturés pour 96 µg de bactériochlorophylle. Les chromatophores des bactéries cultivées en présence de 2-OHBP contiennent 11 µg de caroténoïdes (dont 9 µg de phytoène) pour 67 µg de bactériochlorophylle.

Comme nous l'avons vu précédemment (tableau 19) la valeur du rapport bactériochlorophylle/caroténoïdes est plus élevée dans les bactéries inhibées que dans les bactéries normales. Dans le dernier cas, ce rapport est égal à 4,2 alors qu'il est voisin de 6 dans les chromatophores des bactéries cultivées en présence de 2-OHBP.

De même, nous avons vu au Chapitre V que la présence d'inhibiteur amène une modification importante dans la composition en caroténoïdes, mais qu'elle ne réduit pas, de façon sensible, la quantité totale de ces pigments. C'est pourquoi la réduction de la quantité de caroténoïdes, de l'ordre de 50 %, observée dans les chromatophores de bactéries inhibées, laisserait supposer qu'une partie des caroténoïdes n'est pas localisée dans les chromatophores, tout en restant dans la membrane cytoplasmique. Cette hypothèse avait déjà été avancée par GRIFFITHS et STANIER pour le phytoène (68).

Cependant, il n'est pas exclu que la liaison entre le phytoène et un complexe lipoprotéique soit plus labile que celle existant entre les caroténoïdes fortement insaturés et un complexe identique. C'est pourquoi, au cours des nombreuses manipulations nécessaires à la purification des chromatophores, une partie des pigments photosynthétiques pourrait quitter cette structure membranaire. Il faut cependant reconnaître que ces hypothèses n'ont reçu, jusqu'ici, aucune confirmation.

V - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA COMPOSITION EN PROTEINES
DES CHROMATOPHORES DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

L'analyse des protéines de différents mutants de Neurospora crassa (143) a permis d'isoler un complexe protéique induit par la lumière, et qui serait capable d'effectuer la synthèse des caroténoïdes à partir d'un précurseur en C₄₀.

Chez *Rh. rubrum*, OELZE et DREWS (144) ont mis en évidence, par migration électrophorétique, plusieurs bandes dénommées A, B, C, D, E, F qui correspondraient à différents groupes protéiques de la membrane cytoplasmique et des thylakoïdes.

L'inhibition de la caroténogénèse par le 2-OHBP pouvant entraîner un changement dans la distribution des protéines intervenant dans les synthèses pigmentaires, nous avons isolé par différentes méthodes, les protéines des chromatophores issus de bactéries cultivées en absence d'inhibiteur (expérience a), en présence de 120 μ M (expérience b) et de 165 μ M de 2-OHBP (expérience c).

Les chromatophores qui correspondent à ces différentes expériences ont été scindés en deux fractions, l'une a été traitée selon la méthode de BAUM (50), et l'autre selon celle de SEGEN et GIBSON (51).

A - Traitement des chromatophores selon la méthode de BAUM

Les chromatophores ont été traités par un mélange phénol - urée - acide acétique - eau et les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Après fixation et coloration, l'intensité des différentes bandes protéiques a été mesurée au spectrophotomètre à 546 nm.

Les enregistrements densitométriques des différents électrophorégrammes sont reproduits dans la figure 14.

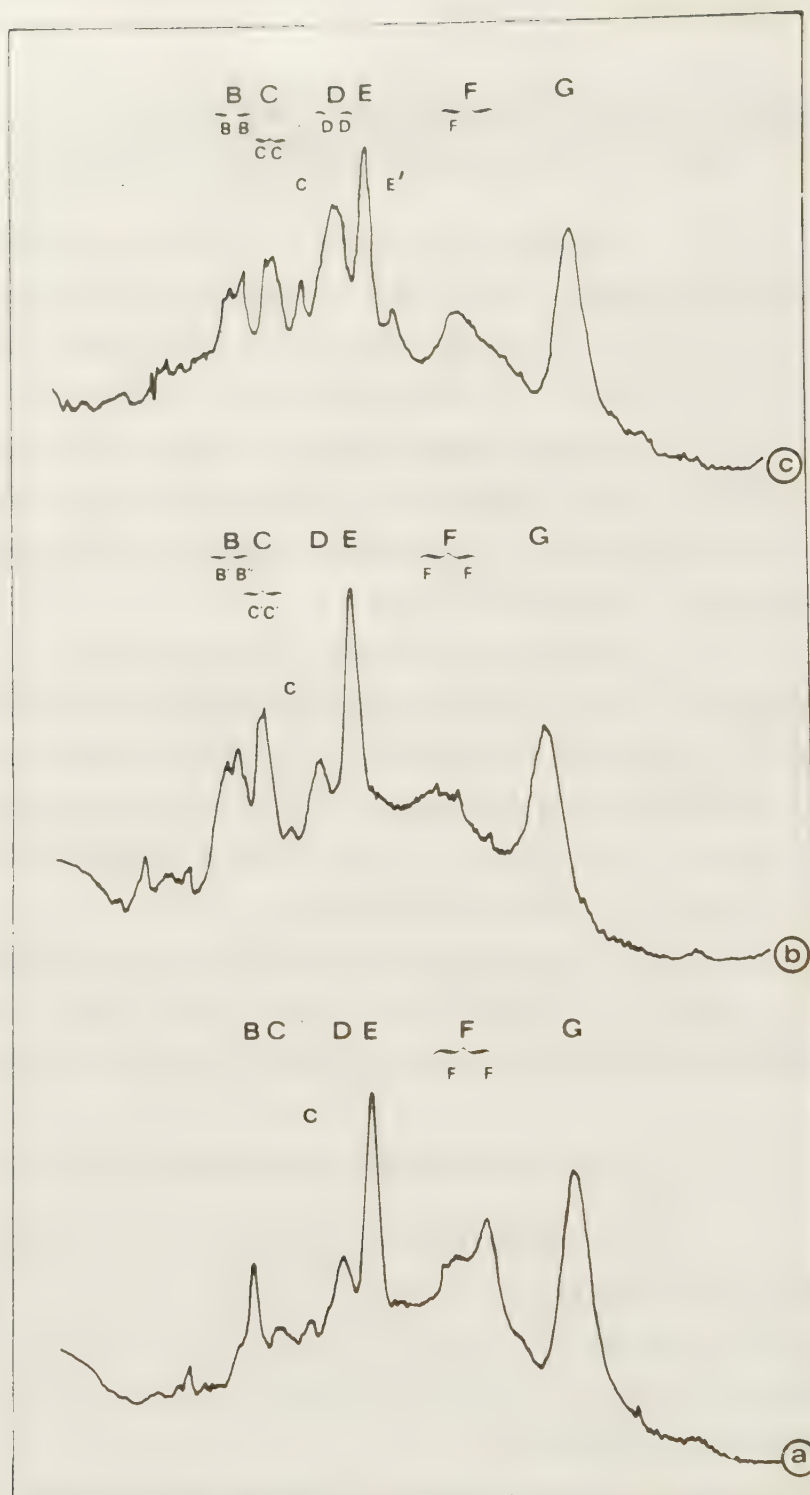


Figure 14 : Enregistrements densitométriques des électrophorégrammes
(Méthode de BAUM)

La migration a lieu de la gauche vers la droite de la figure

Exp. a : Chromatophores isolés de bactéries cultivées sans inhibiteur.

Exp. b : Chromatophores isolés de bactéries cultivées en présence de
120 μ M de 2-OHBP.

Exp. c : Chromatophores isolés de bactéries cultivées en présence de
165 μ M de 2-OHBP.

La bande E, caractéristique des structures intracytoplasmiques, et la bande G, associée à la synthèse chlorophyllienne, sont importantes dans les trois essais.

Les principales modifications qui interviennent dans la composition protéique des chromatophores b et c, par rapport aux chromatophores a, touchent essentiellement les protéines à migration électrophorétique moyenne. Ainsi, nous assistons à une augmentation relative et à un dédoublement des protéines des bandes B, C et D. Au contraire la bande F, dédoublée dans les chromatophores normaux en F' F'', se réduit pratiquement à la fraction F' dans les chromatophores des bactéries fortement inhibées. Enfin la bande E' serait caractéristique des chromatophores isolés de ces mêmes bactéries (essai c).

Ces observations suggèrent que les principales modifications apportées par le 2-OHBP concernent surtout les protéines communes aux chromatophores et à la membrane cytoplasmique (bande C, D, F) plutôt que les protéines propres aux chromatophores (bande E) ou à la synthèse de la bactériochlorophylle (bande G).

Enfin, l'apparition de bandes supplémentaires serait en rapport avec des changements dans l'activité enzymatique de la membrane cytoplasmique. Ainsi des variations de l'activité NADH oxydase pourraient être à l'origine des modifications de la bande B (144).

B - Analyse des protéines des chromatophores traités selon la technique de SEGEN et GIBSON (51)

Dans une autre série d'expériences, les chromatophores ont été portés dix minutes à 100°C en présence de laurylsulfonate de sodium et de β mercaptoéthanol. Les protéines ont ensuite été analysées par électrophorèse sur gel dans les mêmes conditions que ci-dessus et les enregistrements des électrophorégrammes sont rassemblés dans la figure 15.

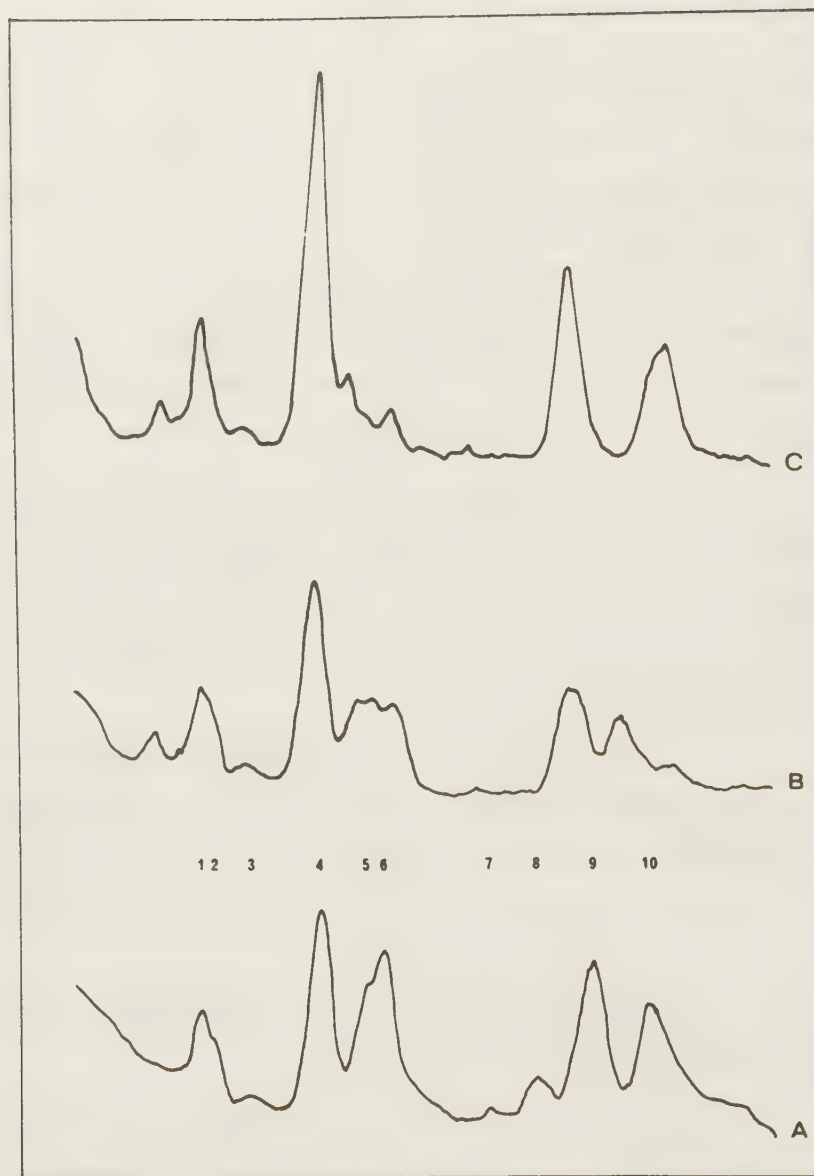


Figure 15 : Enregistrements densitométriques des électrophorégrammes
(méthode de SEGEN et GIBSON)

Les protéines des chromatophores des bactéries normales se séparent en dix bandes dont les plus importantes sont représentées par les pics 4, 5, 6, 9 et 10 (enregistrement A). En présence de quantités croissantes d'inhibiteur (enregistrements B et C), on observe les phénomènes suivants : une première bande de migration lente apparaît, à gauche du pic 1 et la bande 4 prend de plus en plus d'importance ; les bandes 5 et 6 diminuent fortement tandis qu'une nouvelle bande apparaît à droite du pic 6 ; le pic 7 devient de plus en plus faible, le pic 8 disparaît, mais les bandes 9 et 10 restent toujours très importantes.

Des protéines à migration rapide et qui joueraient un rôle essentiel dans la structure du chromatophore, ont été mises en évidence chez *Rps. spheroides* (19) et se rencontreraient principalement dans la fraction subchromatophore qui contient la bactériochlorophylle chargée de capter l'énergie lumineuse (51). En revanche, ces protéines seraient pratiquement absentes dans les chromatophores de mutants de cette même bactérie.

Pour notre part, nous n'avons pas observé de diminution des bandes correspondant aux protéines à migration rapide quelle que soit la composition en caroténoïdes. En revanche, il existe des différences très nettes dans l'importance relative des protéines à migration moyenne entre les chromatophores des bactéries cultivées en absence de 2-OHBP et ceux des bactéries cultivées en présence d'inhibiteur.

VI - INFLUENCE DU 2-HYDROXYBIPHENYLE SUR LA MORPHOLOGIE DE RHODOSPIRILLUM RUBRUM

Si les mutants de bactéries photosynthétiques, dépourvus de caroténoïdes colorés, ont fait l'objet de nombreux travaux en ce qui concerne la morphologie des chromatophores, les bactéries, dont la caroténogénèse a été inhibée par voie chimique, n'ont pas suscité le même intérêt. En particulier, il ne semble pas, à notre connaissance, qu'une étude de microscopie électronique ait déjà été entreprise chez ces bactéries.

Pour cette partie de notre travail, nous avons choisi *Rh. rubrum* de préférence à *Rps. spheroides* car l'inhibition de la caroténogénèse, provoquée par le 2-OHBP, y est plus importante.

Nous avons tout d'abord comparé la morphologie des bactéries entières au cours de la croissance et en fonction de l'inhibition de la caroténogénèse. Nous avons ensuite étendu cette étude aux chromatophores correspondants.

A - Etude morphologique des bactéries entières

Nous avons utilisé l'influence du 2-OHBP sur le développement du système membranaire en fonction du temps. Toutes les cultures ont été effectuées en incubateur de laboratoire dans les mêmes conditions de température, d'anaérobiose, d'éclairement et d'âge de l'inoculum.

Nous avons d'abord établi les courbes de croissance des bactéries normales et des bactéries inhibées en mesurant la densité optique à 610 nm et 680 nm en fonction du temps.

La figure 16 reproduit ces courbes.

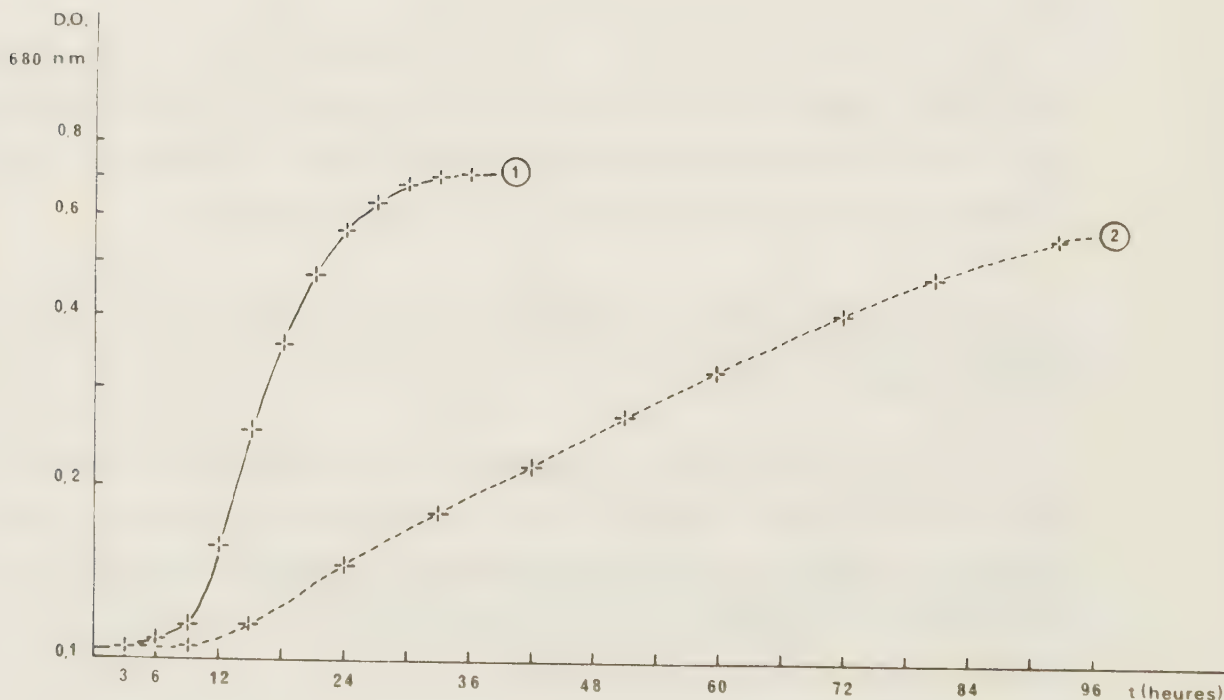


Figure 16 : Courbes de croissance de Rhodospirillum rubrum

- 1 ——— culture normale
- 2 - - - - - culture en présence de 165 μM de 2-OHBP

Alors que les bactéries cultivées en absence d'inhibiteur ne montrent aucune phase de latence, les bactéries cultivées en présence de 2-OHBP présentent une phase de latence d'environ 9 heures. De plus le temps de génération, d'environ 6 heures pour les bactéries normales, est voisin de 34 heures pour les bactéries inhibées.

1) Bactéries cultivées en absence d'inhibiteur
.....

Les prélèvements en vue d'un examen au microscope électronique ont été effectués toutes les 3 heures après l'ensemencement.

Les clichés 1 à 9 des planches I et II montrent l'évolution de la morphologie des bactéries normales au cours du temps. Il est à noter que le développement des structures vésiculaires a lieu très rapidement et que les invaginations intracytoplasmiques sont d'autant plus nombreuses que les cellules sont plus âgées. Le développement des chromatophores s'effectue toujours de la périphérie vers l'intérieur de la bactérie. Ces résultats sont en parfait accord avec les nombreuses données de la littérature (121).

2) Bactéries cultivées en présence de 2-hydroxybiphényle
.....

A cause de la croissance lente des bactéries dont la caroténogénèse est inhibée, les prélèvements en vue des examens microscopiques n'ont été effectués que toutes les 9 heures.

Les clichés (10 à 17) de la planche III retracent la morphogénèse du système membranaire de ces bactéries.

Contrairement à toute attente, les cellules prélevées au début de la phase exponentielle de croissance, présentent une certaine hétérogénéité. En effet, une étude statistique au microscope électronique a montré qu'environ 55 % des bactéries étaient dépourvues de chromatophores (clichés 10 à 12). Cette absence de thylakoïdes s'explique difficilement. En effet, ainsi que nous l'avons vu plus haut, la teneur en bactériochlorophylle qui gouverne la formation des chromatophores, n'est pas affectée par le 2-OHBP.

Enfin, chez ces bactéries dépourvues de chromatophores, il faut attendre environ 30 heures avant d'observer nettement l'amorce

d'invaginations membranaires (cliché 13) qui, à mesure de la croissance, se multiplient pour atteindre un nombre comparable à celui observé dans les bactéries normales (clichés 16 et 17).

Il semble donc que le 2-OHBP amène très rapidement une modification du système membranaire des bactéries de l'inoculum, mais lorsque la division cellulaire reprend, il y a alors formation d'un appareil photosynthétique d'apparence normale.

Dans une autre série d'expériences, les bactéries ont été mises en présence d'une concentration d'inhibiteur deux fois plus élevée que celle utilisée précédemment. Dans ces conditions, aucune multiplication cellulaire n'a eu lieu mais les bactéries ont conservé leur pigmentation initiale. L'anaérobiose et l'illumination ont été maintenues pendant toute la durée de l'expérience et des prélèvements ont été effectués 12, 24 et 36 heures après ensemencement.

Les clichés 26, 27, 28 et 29 de la planche IV correspondent à ces différents prélèvements.

Dans ces conditions, les cellules ne montrent plus les invaginations membranaires habituelles situées à la périphérie de la cellule et nous observons pour la première fois, l'apparition de structures qui rappellent l'empilement régulier des doubles membranes dans les grana des chloroplastes (planche IV).

Il semble donc qu'il y ait eu tout d'abord arrêt du développement des membranes intracytoplasmiques (cliché 26) cassure de celles-ci (cliché 27) puis réarrangement en un système membranaire concentrique au sein du cytoplasme (clichés 28 et 29).

Par ailleurs, SCHÖN (145) a observé très récemment chez *Rh. rubrum*, une transformation analogue des vésicules intracytoplasmiques en aggrégats membranaires irréguliers. Ces modifications ont lieu en absence de source azotée aussi bien à la lumière en anaérobiose ou en aérobiose, qu'à l'obscurité en aérobiose, et leur importance dépend non seulement de la nature de la source carbonée mais encore de celle de la phase gazeuse. C'est ainsi qu'elles sont relativement importantes dans les cellules placées pendant 4 jours en aérobiose à la lumière et en présence d'acétate. Au contraire, les modifications sont beaucoup plus

faibles lorsque, dans les mêmes conditions, l'aérobiose est remplacée par l'anaérobiose.

Une modification de l'équilibre d'oxydo-réduction au niveau de la membrane pourrait intervenir dans les transformations des chromatophores (145), mais l'exigence en substrat reflète de toute façon l'existence de synthèses cellulaires. Ceci s'oppose donc à la thèse selon laquelle les réarrangements membranaires ne seraient que l'expression de bactéries en voie de disparition.

De telles altérations membranaires restent inexplicables mais il semble toutefois qu'elles ne résultent pas d'une nouvelle synthèse de lipides et de protéines. On assiste, en effet, en présence de 2-OHBP, à une disparition progressive des vésicules intracytoplasmiques et à l'apparition concomitante de nouvelles structures qui restent en continuité avec la membrane cytoplasmique (clichés 26 et 27).

B - Etude morphologique des chromatophores issus de bactéries cultivées en absence et en présence d'inhibiteur

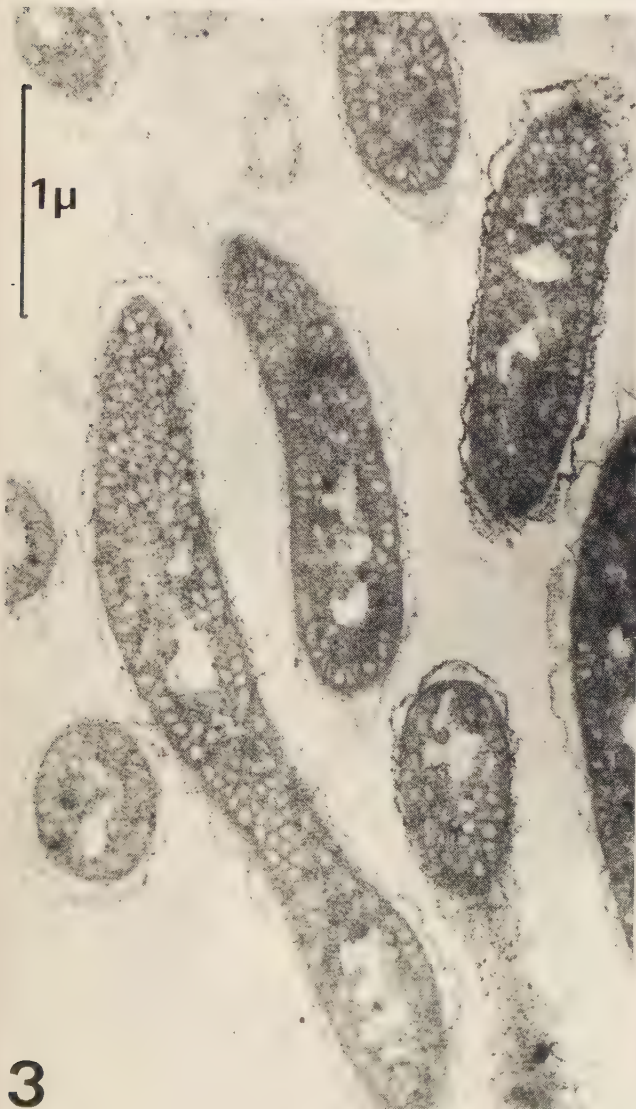
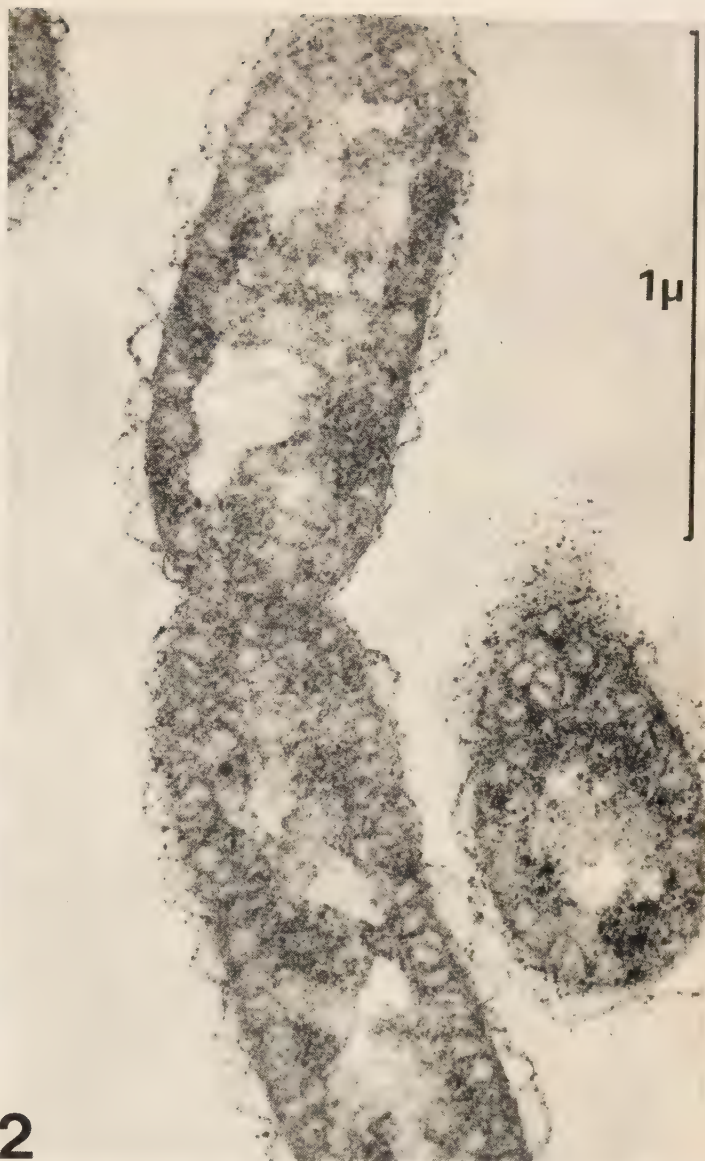
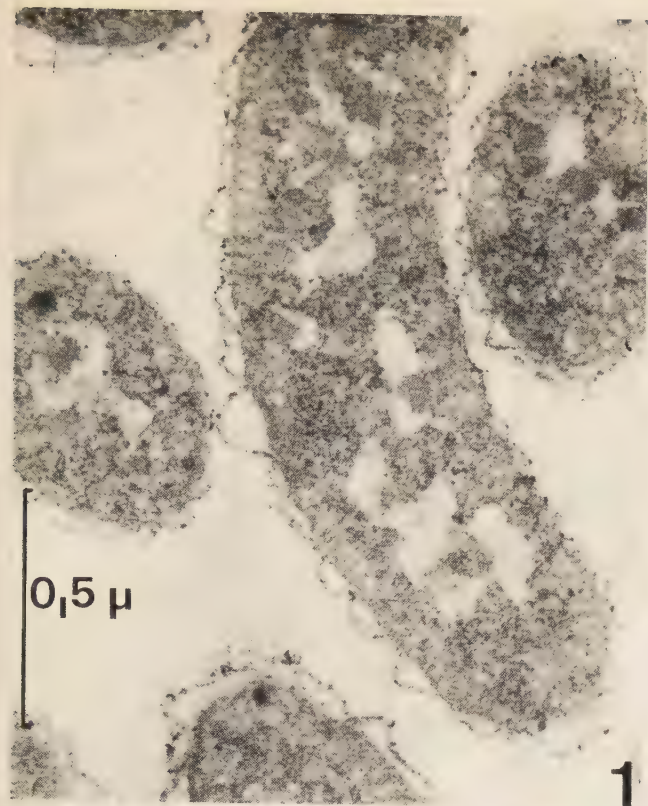
Après avoir comparé la morphologie des bactéries entières, il était intéressant d'étudier l'influence du 2-OHBP sur la morphologie des chromatophores de bactéries cultivées en anaérobiose à la lumière.

Afin d'obtenir des chromatophores en quantité suffisante, nous avons prélevé les bactéries à la fin de la phase exponentielle de croissance.

La comparaison des clichés des planches V (bactéries normales) et VI (bactéries inhibées) montre que le 2-OHBP ne semble pas modifier de façon appréciable la morphologie des chromatophores à ce stade de la croissance. Ceux-ci se présentent dans les deux cas sous forme de vésicules assez homogènes dont les dimensions sont comprises entre 300 et 1 000 Å. Les particules dont la taille est voisine de 150 Å sont des contaminants fréquents (146) qui pourraient éventuellement représenter des ribosomes de type 70 S.

Planche I

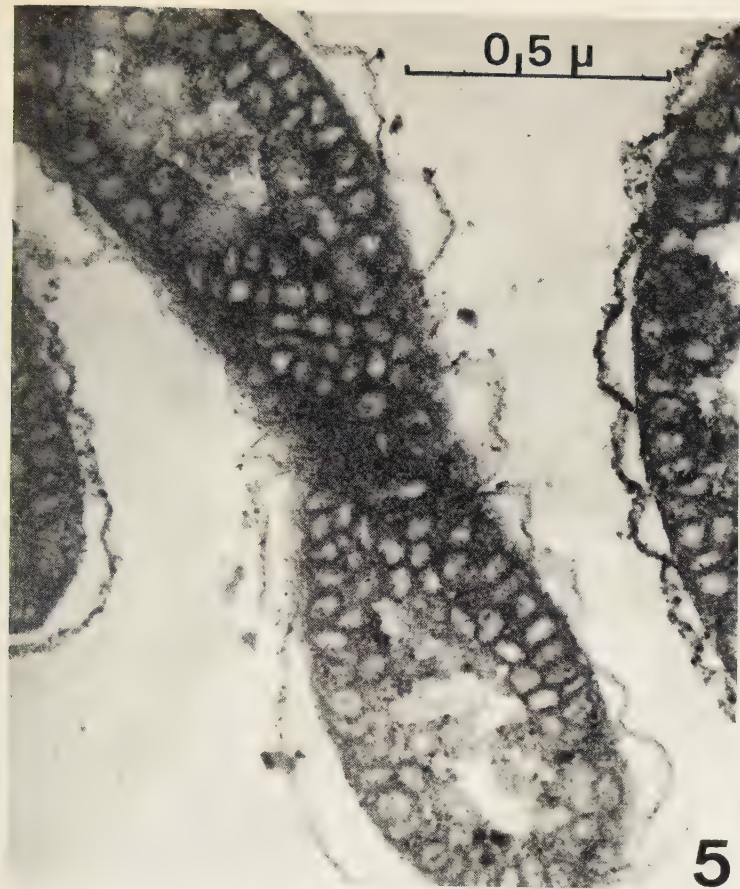
Bactéries cultivées sans inhibiteur et respectivement
âgées de 3 heures (cliché 1), 6 heures (cliché 2) et 9 heures
(clichés 3 et 4).



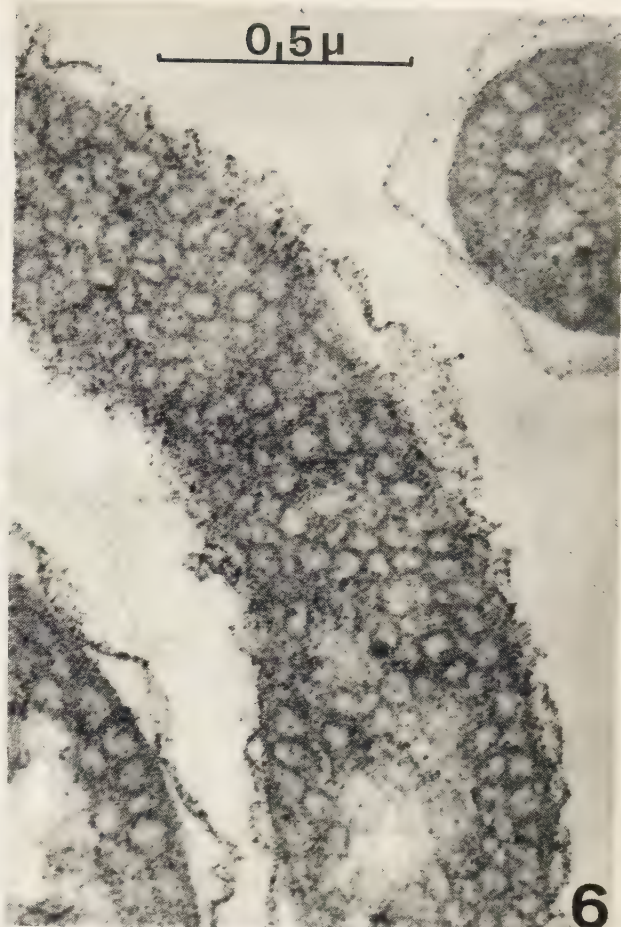
RHODOSPIRILLUM RUBRUM (Bactéries normales)

Planche II

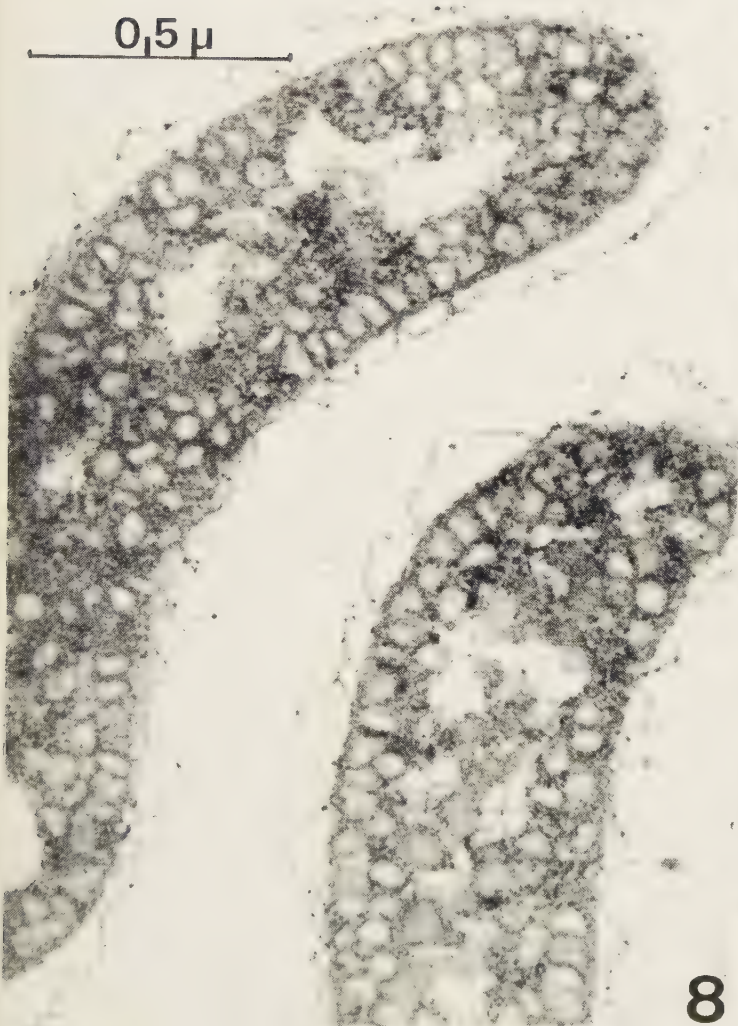
Bactéries cultivées sans inhibiteur et respectivement
âgées de 15 heures (clichés 5, 6 et 7) et 18 heures (clichés
8 et 9).



5



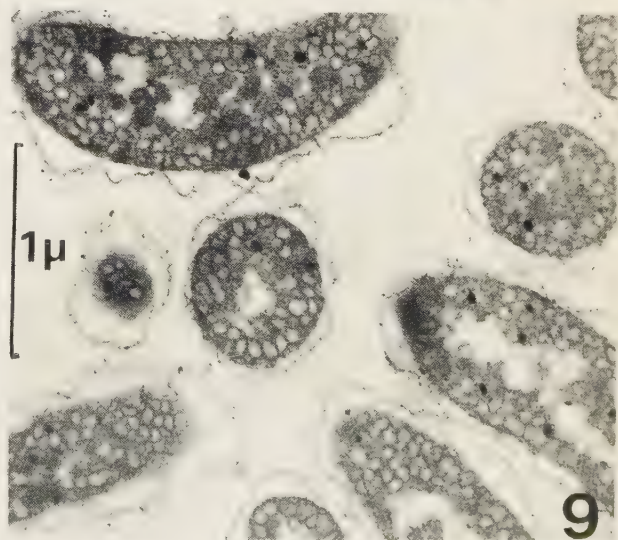
6



8



7

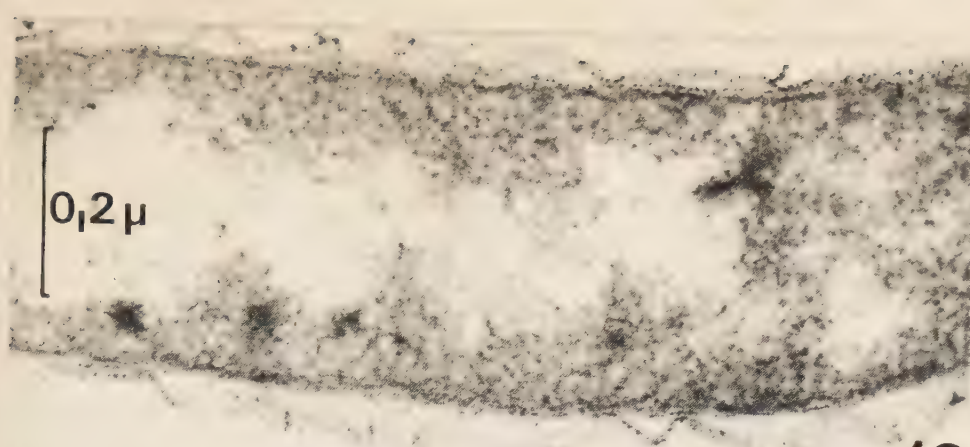


9

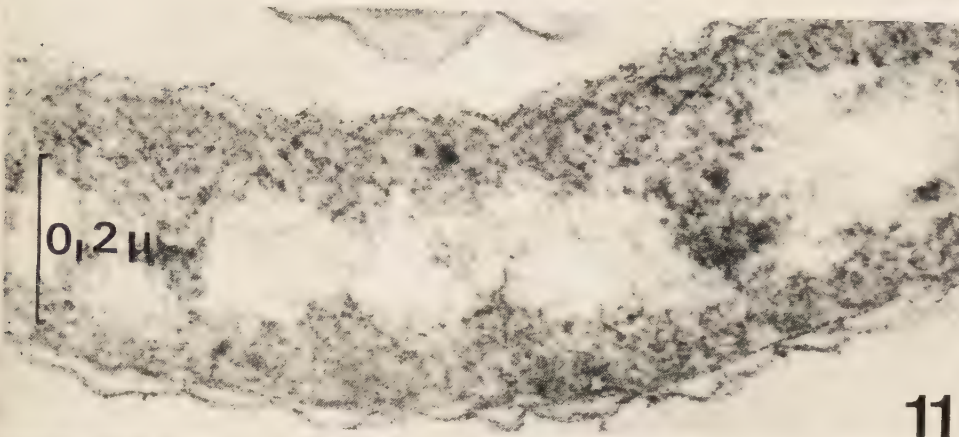
RHODOSPIRILLUM RUBRUM (Bactéries normales)

Planche III

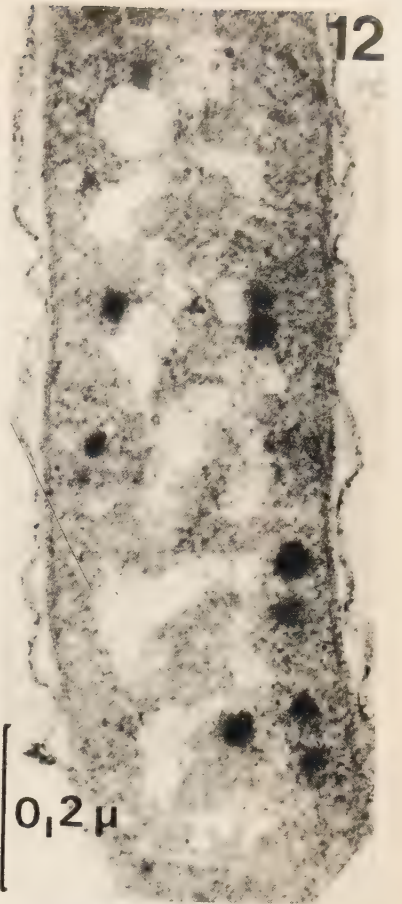
Bactéries cultivées en présence de 165 μ M de 2-hydroxy-biphényle, respectivement âgées de 9 heures (clichés 10 et 11), 18 heures (cliché 12), 27 heures (cliché 13), 36 heures (clichés 14 et 15) et 45 heures (clichés 16 et 17).



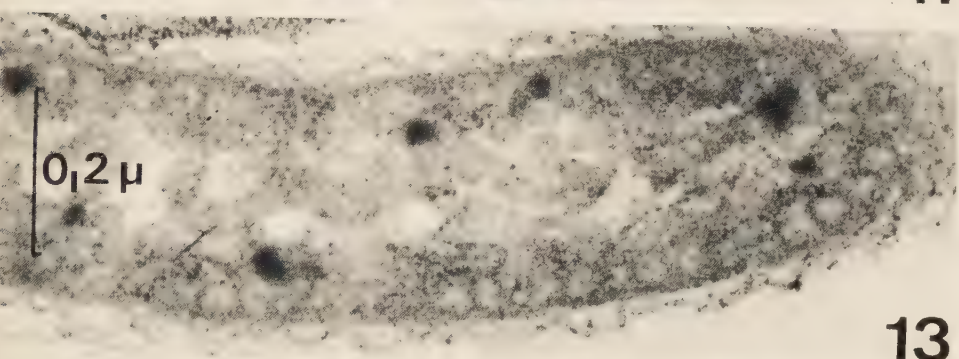
10



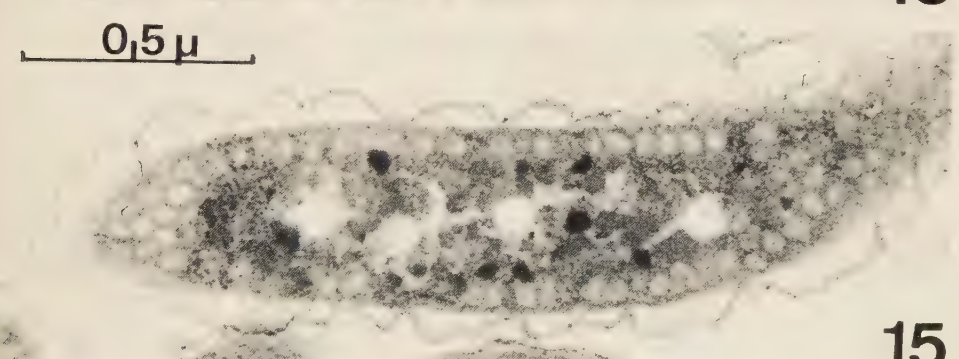
11



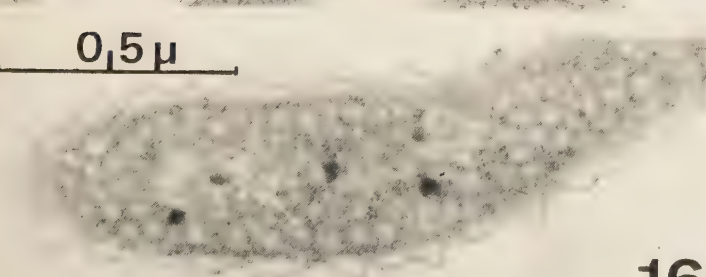
12



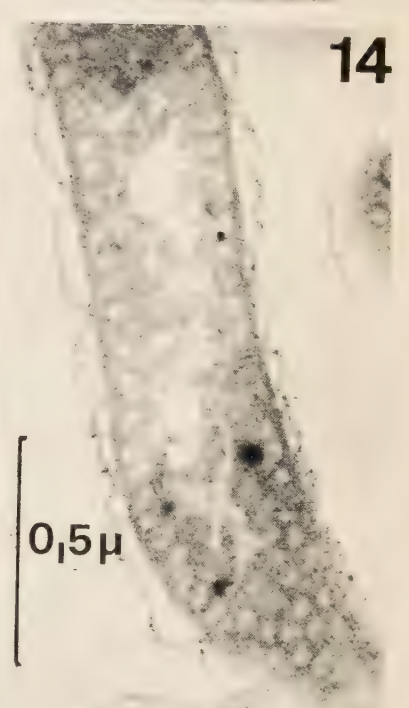
13



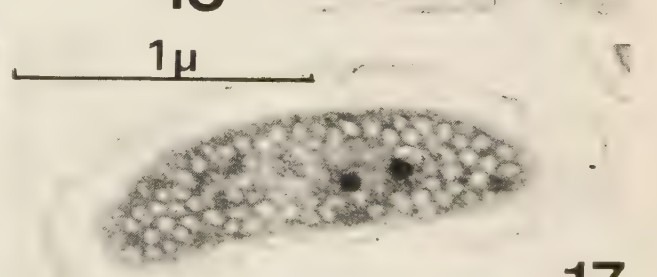
15



16



14



17

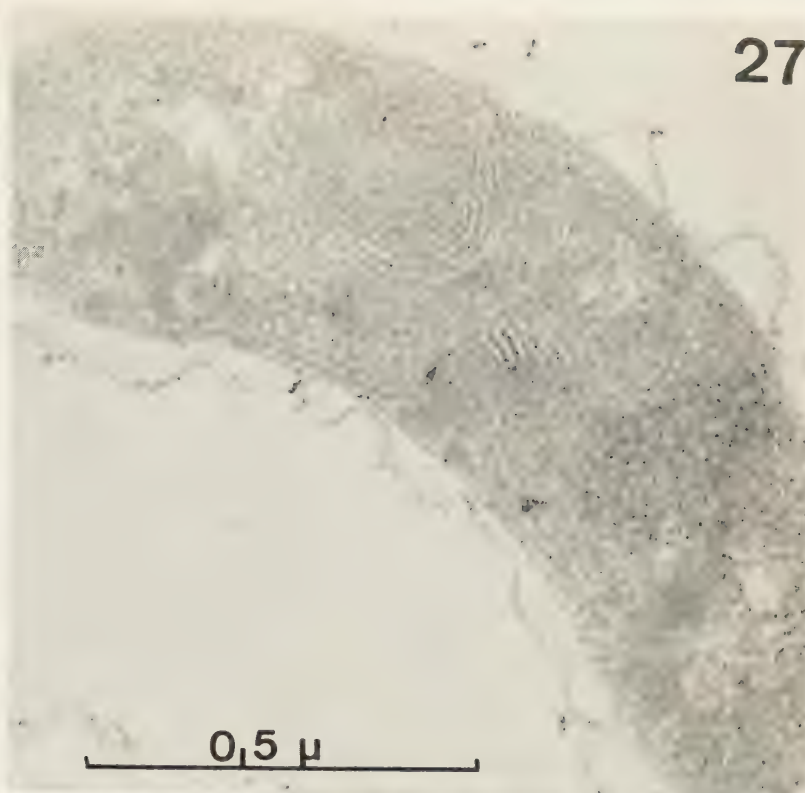
Planche IV

Evolution du système membranaire des bactéries, cultivées en présence de 330 μ M de 2-hydroxybiphényle pendant respectivement 12 heures (cliché 26), 24 heures (cliché 27) et 36 heures (clichés 28 et 29).

26



27



0,1 μ



0,5 μ

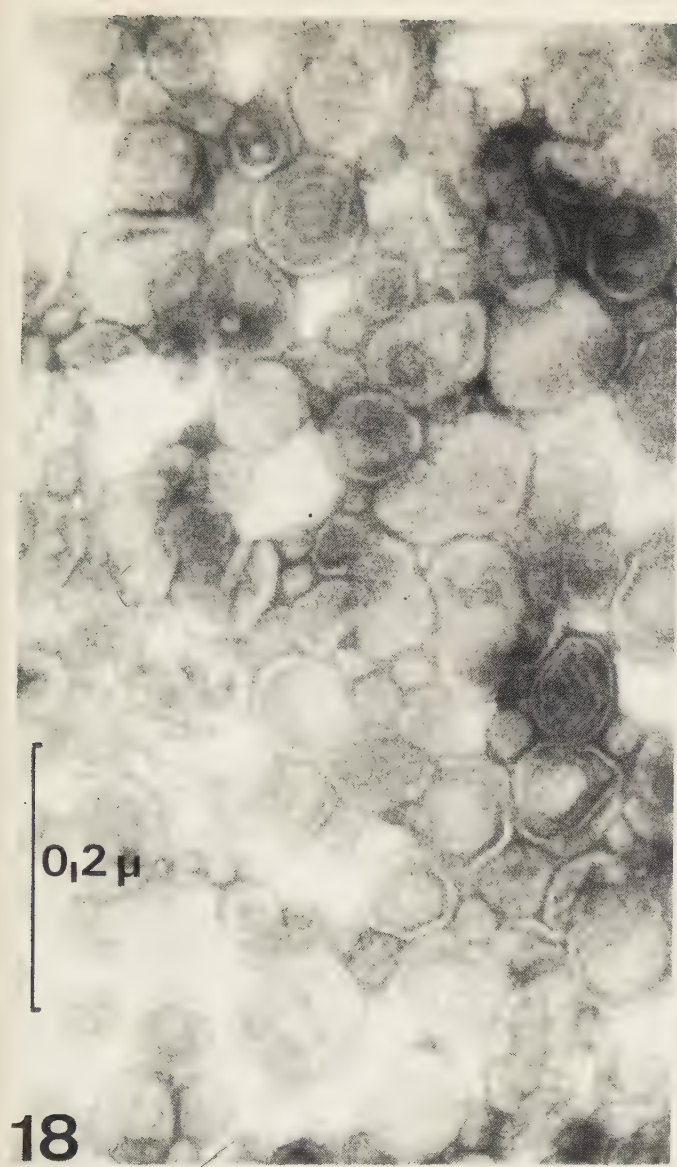
28



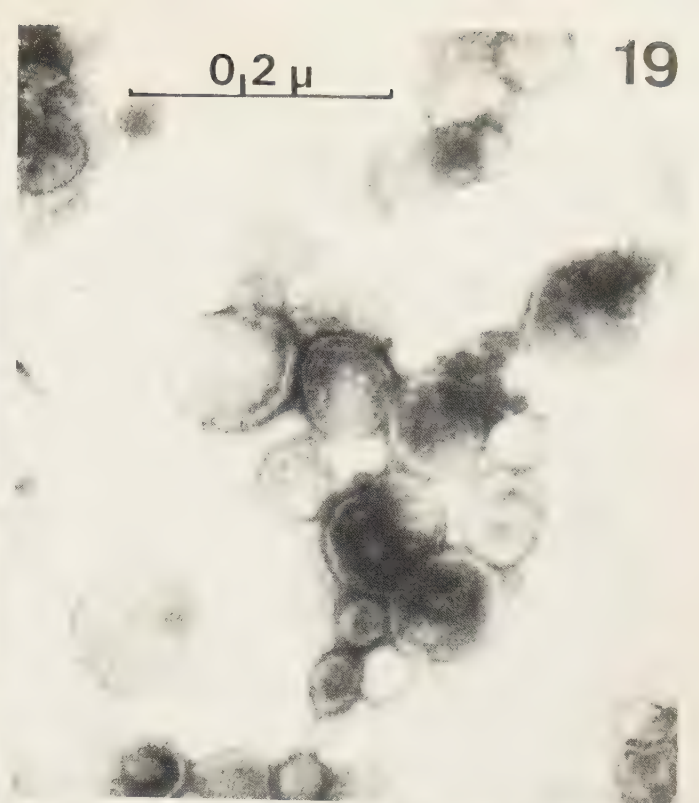
29

Planche V

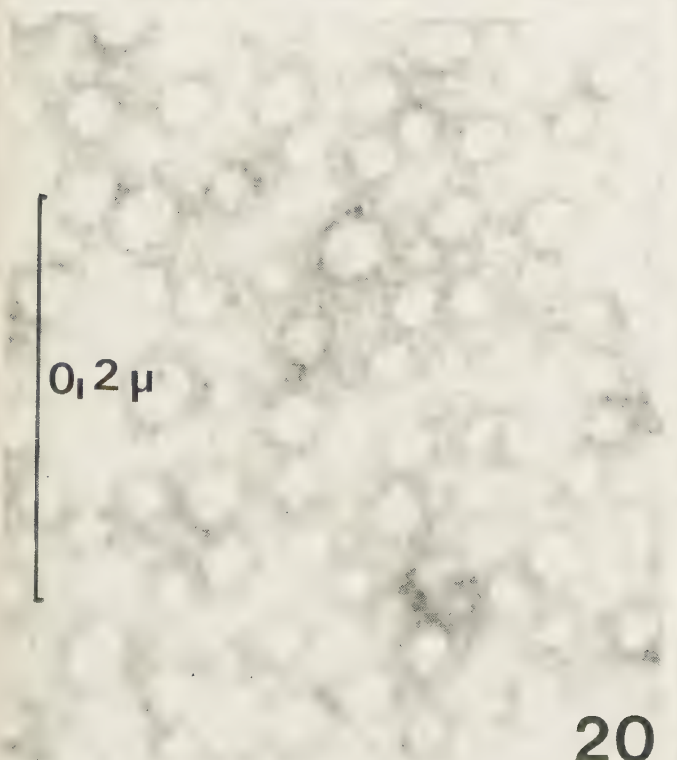
Chromatophores de bactéries cultivées sans inhibiteur pendant 48 heures (clichés 18 et 19) et subparticules obtenues après traitement des chromatophores au Triton X-100 (clichés 20 et 21).



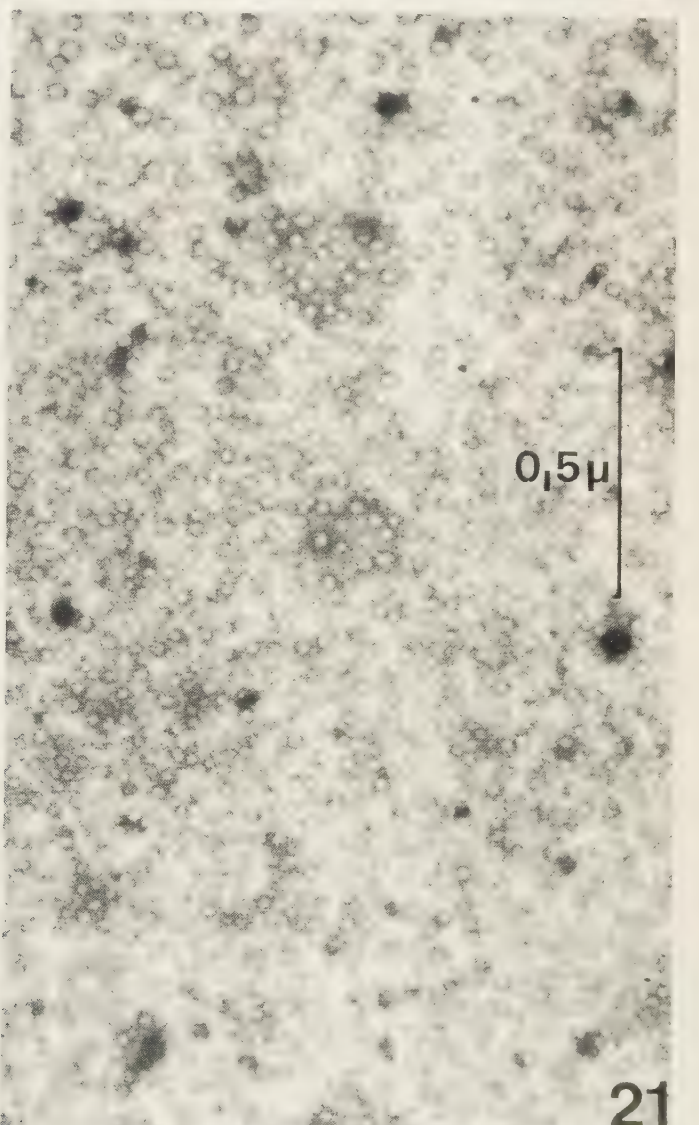
18



19



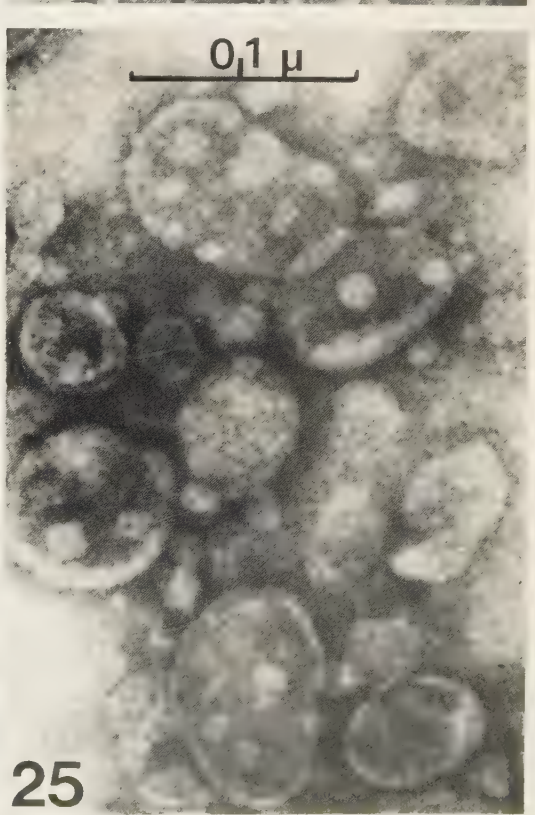
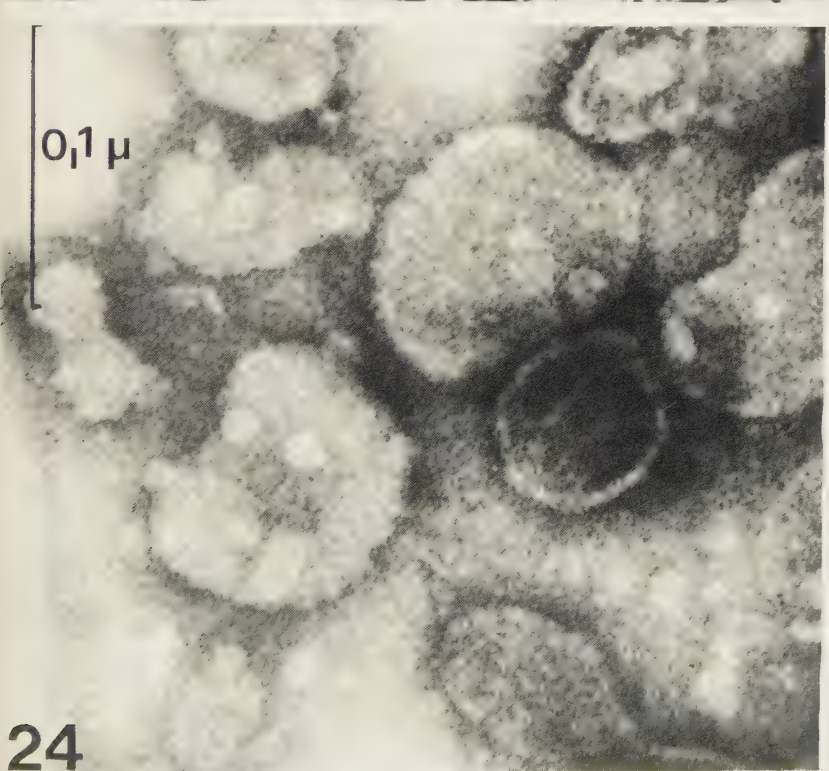
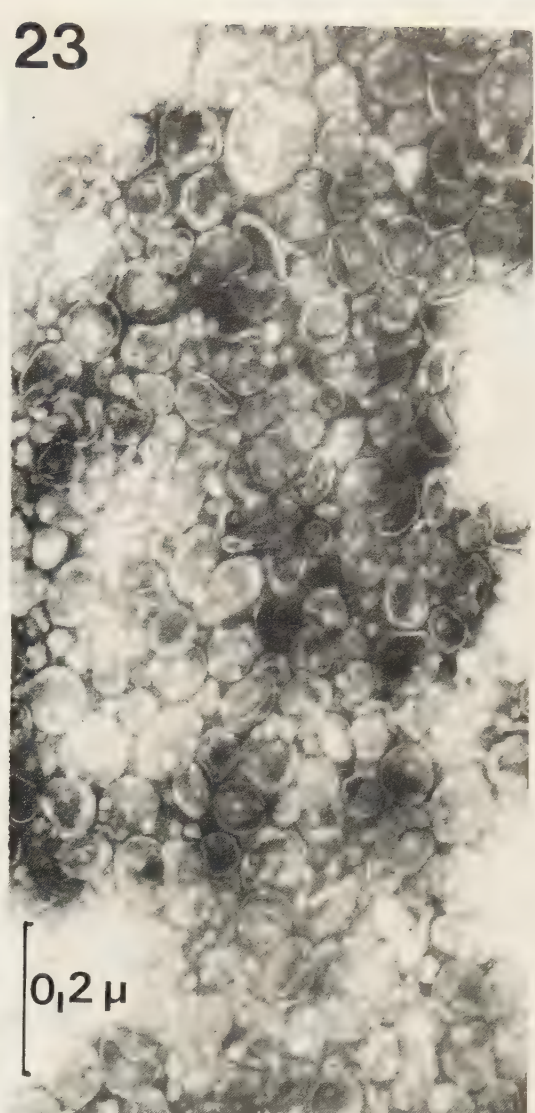
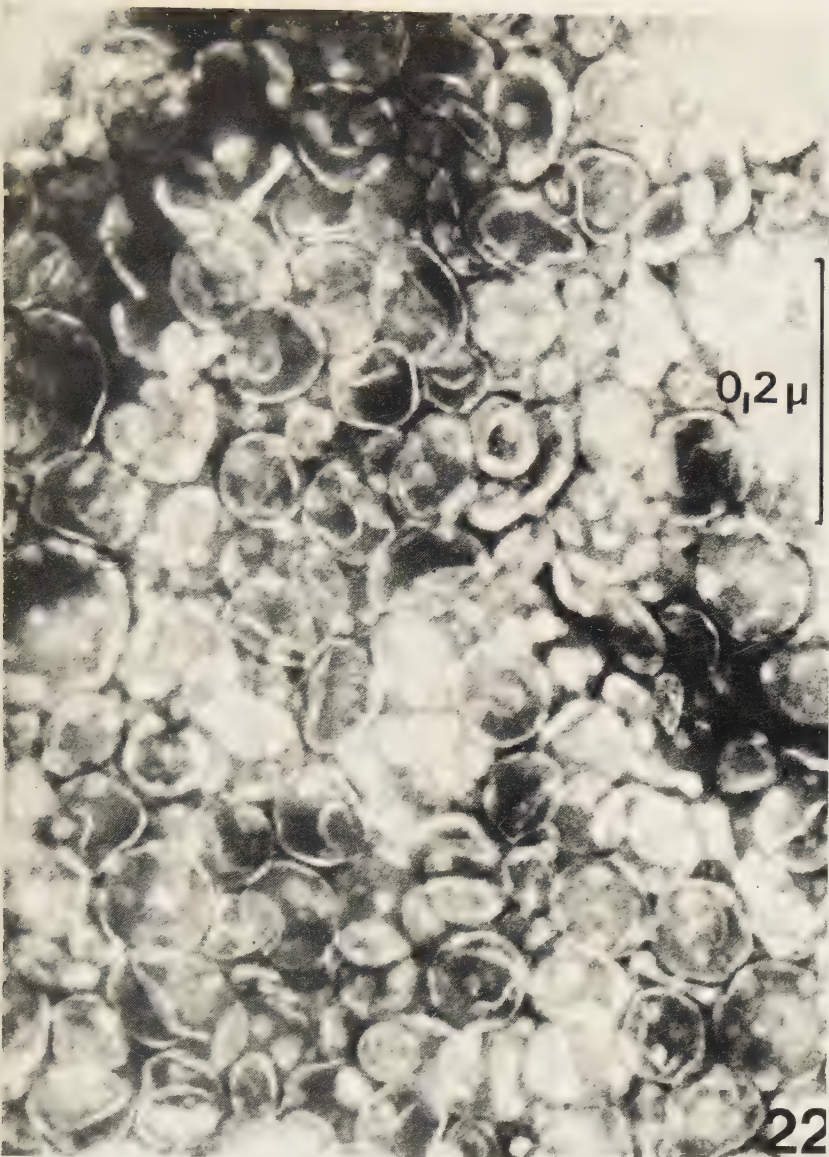
20



21

Planche VI

Chromatophores de bactéries cultivées en présence de
165 μ M de 2-hydroxybiphenyle pendant 72 heures (clichés 22, 23,
24 et 25).



RHODOSPIRILLUM RUBRUM (Chromatophores des bactéries inhibées)





C O N C L U S I O N

Les premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes sont identiques à celles de la formation des stérols jusqu'au stade du pyrophosphate de farnésyle (C_{15}). La dimérisation de ce dernier (10) conduit au squalène (C_{30}), tandis que la formation du phytoène implique la condensation préalable d'une molécule de pyrophosphate de farnésyle avec une nouvelle unité en C_5 pour conduire tout d'abord au pyrophosphate de géranylgéranyle (C_{20}). Celui-ci se condenserait ensuite sur lui-même (11) pour donner le phytoène (C_{40}).

Si les mécanismes d'allongement des chaînes jusqu'en C_{15} ou C_{20} sont assez bien connus, ceux qui ont lieu au niveau des dimérisations sont encore purement hypothétiques et font intervenir un certain nombre d'intermédiaires, aussi bien pour la synthèse du squalène que pour celle du phytoène. Un de ces intermédiaires, dénommé présqualène (6), a été isolé et sa structure qui comporte un cycle cyclopropanique a été récemment confirmée (9). Depuis peu, le préphytoène, homologue supérieur en C_{40} du présqualène, aurait également été mis en évidence chez une mycobactérie (12).

Un mécanisme a déjà été proposé pour rendre compte de la formation préférentielle de phytoène cis (11) alors qu'il ne semble pas que cet aspect de la biosynthèse des caroténoïdes ait été reconsidéré dans la transformation du préphytoène.

La stéréochimie des polyènes a fait l'objet de très nombreux travaux et l'on a remarqué depuis fort longtemps, qu'en règle générale, les caroténoïdes naturels possèdent une configuration all trans. Les deux premiers précurseurs en C₄₀ à savoir, le phytoène et le phytofluène, possèdent cependant une configuration cis et il faut donc admettre qu'une isomérisation intervient lors de la transformation du phytofluène en ζ carotène.

Or, l'étude stéréochimique du phytoène et du phytofluène, isolés à partir de cellules de *Rh. rubrum* et *Rps. spheroides*, mises en présence de 2-OHBP et de 9-fluorénone, nous a permis d'établir pour la première fois, de façon irréfutable, que 70 % de ces deux polyènes existent sous forme all trans. Des résultats analogues ont été obtenus chez *Flavobacterium dehydrogenans* (13), *Rh. rubrum* (91) et *Verticillium agaricinum* (147).

Comme pour beaucoup d'autres métabolismes, la mise en évidence des précurseurs des caroténoïdes chez les bactéries photosynthétiques ne peut être obtenue que par l'interruption de la biosynthèse soit par mutation soit à l'aide d'inhibiteurs. Nous avons recherché parmi diverses familles de composés chimiques une substance capable de bloquer la caroténogénèse de façon aussi efficace que possible. Malgré de nombreux essais, nous n'avons pu retenir que le 2-OHBP, ce qui indique d'ailleurs, qu'une certaine structure est requise, pour obtenir une inhibition sélective.

La relation entre structure moléculaire et activité biologique est cependant difficile à établir mais nous avons pu montrer que l'activité anticaroténogène est surtout fonction de la conjugaison entre les cycles aromatiques.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'action inhibitrice de diverses molécules. C'est ainsi qu'une analogie isostérique entre la DPA et le centre de la molécule de phytoène a été proposée pour invoquer une inhibition de la phytoène deshydrogénase. En fait, il ne semble pas que les inhibiteurs déjà utilisés possèdent une spécificité aussi étroite. Nous avons montré, en particulier, que le 2-OHBP réprime également la synthèse des ubiquinones et diminue de façon considérable l'activité de la NADH oxydase.

Bien que le rôle du phytoène en tant que précurseur des caroténoïdes ne puisse plus être mis en doute actuellement, les preuves expérimentales font encore défaut pour assurer lequel des deux isomères, cis ou trans, représente la forme métaboliquement active.

Au cours des levées d'inhibition nous avons observé à la fois une synthèse endogène de certains pigments et une destruction importante de certains autres, ce qui rend très difficile malheureusement toute étude cinétique d'interconversion des polyènes (150).

Par ailleurs nous avons remarqué que la quantité de phytoène trans isolé des cultures dépend de la nature de l'inhibiteur et des conditions d'éclairement utilisées. Ainsi cet isomère est particulièrement abondant lorsque l'inhibiteur de la caroténogenèse possède en outre des propriétés photochimiques. C'est pourquoi, sans exclure la participation d'un mécanisme enzymatique, nous avons envisagé l'hypothèse d'une isomérisation du phytoène sensibilisée par la 9-fluorénone.

Nous avons établi les spectres, jusque là inconnus, de fluorescence et de phosphorescence des isomères du phytoène, ce qui nous a permis d'évaluer l'énergie des états métastables de ces molécules. Nous avons alors proposé un mécanisme d'isomérisation du phytoène par transfert d'énergie triplet-triplet.

Les modifications importantes de la caroténogenèse dues au 2-OHBP nous ont également incités à étudier l'influence de celui-ci sur la morphogenèse de l'appareil photosynthétique de *Rh. rubrum*. S'il n'y a pas de modifications sensibles entre les chromatophores des bactéries normales et inhibées, à la fin de la phase exponentielle de croissance, en revanche le 2-OHBP réprime de façon très importante la formation de ces structures intracytoplasmiques au début de la croissance bactérienne.

Pour des doses élevées d'inhibiteur, nous avons même assisté à une différenciation des chromatophores suivie d'un réarrangement en un aggrégat de membranes concentriques d'un type très particulier. Des modifications semblables viennent d'être signalées dans des cellules de *Rh. rubrum* privées de source azotée mais dans des conditions d'incubation où le substrat carboné et l'oxygène jouent un rôle prépondérant (145). Il ne semble pas cependant que ces réarrangements membranaires soient le résultat de conditions défavorables à la croissance. Ils n'ont en particulier jamais été rencontrés lorsque *Rh. rubrum* est cultivé en anaérobiose à

l'obscurité ce qui constitue bien, pour une bactérie photosynthétique, des conditions particulièrement mal adaptées à la multiplication (151).

Une action aussi marquée du 2-OHBP sur l'organisation du système membranaire nous a incités à étudier la composition en protéines des thylakoïdes chez les bactéries normales et traitées au 2-OHBP. Après analyse électrophorétique nous avons alors observé que les protéines propres aux chromatophores et à la synthèse de la bactériochlorophylle ne sont pas affectées tandis que les protéines, communes à la fois à la membrane cytoplasmique et aux chromatophores, montrent des différences qualitatives et quantitatives importantes.

La localisation in situ du phytoène dans les fractions chromatophores et subchromatophores est d'un accès difficile car l'absorption de cette molécule est masquée principalement par celle des protéines, mais nous avons montré que les caroténoïdes colorés sont toujours associés aux différentes formes de bactériochlorophylle. Ce résultat est en désaccord avec ceux de FUJIMORI (142) mais nos conditions expérimentales ont évité l'altération importante de la bactériochlorophylle évidente dans les spectres d'absorption publiés par cet auteur.

Beaucoup de phénomènes associés à l'évolution de l'appareil photosynthétique des bactéries restent encore à élucider et en particulier l'influence de l'insaturation des caroténoïdes. Le 2-OHBP entraînant une modification importante de celle-ci, ouvre de nouvelles perspectives d'investigation. De plus, cet inhibiteur qui offre la possibilité de modifier la morphologie des chromatophores, devrait permettre d'aborder l'étude des systèmes membranaires d'une façon entièrement nouvelle.

B I B L I O G R A P H I E

1. ISLER O.
Tentative rules for the nomenclature of carotenoids.
in "Carotenoids".
(1971) Birkhäuser, Basel, 851-864.
2. PORTER J.W. & LINCOLN R.E.
Lycopersicon selections containing a high content of carotenes
and colorless polyenes.
(1950) Arch. Biochem., 27, 390-403.
3. POJAK G. & CORNFORTH J.W.
Substrate Stereochemistry in Squalene biosynthesis.
(1966) Biochem. J., 101, 553-568.
4. CORNFORTH J.W., CORNFORTH R.H., POPJAK G. & YENGOYAN L.
Studies on the biosynthesis of cholesterol.
XX - Steric course of decarboxylation of 5-pyrophosphomevalonate
and of the carbon to carbon bond formation in the biosynthesis of
farnesylpyrophosphate.
(1966) J. Biol. Chem., 241, 3970-3987.
5. DONNINGER C. & POPJAK G.
Studies on the biosynthesis of cholesterol.
XVIII - The stereospecificity of mevaldate reductase and the
biosynthesis of asymetrically labelled farnesylpyrophosphate.
(1966) Proc. Roy. Soc. B. 163, 465-491.
6. RILLING H.C., POULTER C.D., EPSTEIN W.W. & LARSEN B.
Studies on the Mechanism of Squalene Biosynthesis. Presqualene
pyrophosphate, stereochemistry and a mechanism for its conversion
to squalene.
(1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 1783-1785.
7. Van TAMELEN E.E. & SCHWARTZ M.A.
Mechanism of Presqualene Pyrophosphate-Squalene Biosynthesis.
(1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 1780-1782.
8. ALTMAN L.J., KOWERSKI R.C. & RILLING H.C.
Synthesis and Conversion of Presqualene alcohol to Squalene.
(1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 1782-1783.
9. HEINTZ R., BENVENISTE P., ROBINSON W.H. & COATES R.M.
Demonstration and identification of a biosynthetic intermediate
between farnesyl PP and squalene in a higher plant.
(1972) Bioch. Biophys. Res. Com., 49, 1547-1553.

10. CORNFORTH J.W., CORNFORTH R.H., DONNINGER C. & POPJAK G.
Studies on the biosynthesis of cholesterol.
XIX - Steric course of hydrogen eliminations and of C-C bond formations in squalene biosynthesis.
(1966) Proc. Roy. Soc. B., 163, 492-514.
11. WILLIAMS R.J.H., BRITTON G., CHARLTON J.M. & GOODWIN T.W.
The stereospecific biosynthesis of phytoene and polyunsaturated carotenes.
(1967) Biochem. J., 104, 767-777.
12. ALTMAN L.J., ASH L., KOWERSKI R.C., EPSTEIN W.W., LARSEN B.R., RILLING H.C., MUSCIO F. & GREGONIS D.E.
Prephytoene pyrophosphate. A new intermediate in the biosynthesis of carotenoids.
(1972) J. Am. Chem. Soc., 94, 3257-3259.
13. ANDREWES A.G.
Carotenoids of Flavobacterium dehydrogenans Arnaudi.
(1969) Ph. D. Diss. New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico, USA.
14. CLAES H.
Energieübertragung von angeregtem Chlorophyll auf C₄₀ Polyene mit verschiedenen chromophoren Gruppen.
(1961) Z. Naturforschg., 16 b, 445-454.
15. BRIL C.
Studies on bacterial chromatophores
II - Energy transfer and photooxydative bleaching of Bacteriochlorophyll in relation to structure in normal and carotenoid depleted Chromatium.
(1963) Biochim. Biophys. Acta, 66, 50-60.
16. GOEDHEER J.C.
Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophyll in chromatophores of purple bacteria.
(1959) Biochim. Biophys. Acta, 35, 1-8.
17. SISTROM W.R., GRIFFITHS M. & STANIER R.Y.
The biology of a photosynthetic bacterium which lacks coloured carotenoids.
(1956) J. Cell. Comp. Physiol., 48, 473-515.
18. CLAYTON R.K.
Role of H₂O₂ in the photooxydative killing of blue green mutants of Rhodopseudomonas spheroides.
(1961) J. Bacteriol., 82, 314-315.
19. FRAKER P.J. & KAPLAN S.
Isolation and fractionation of the photosynthetic membranes organelles from Rhodopseudomonas spheroides.
(1971) J. Bacteriol., 108, 465-473.

20. JI H., HESS J.L. & BENSON A.A.
Studies on chloroplast membrane structure.
I - Association of pigments with chloroplast lamellar proteins.
(1968) Biochim. Biophys. Acta., 150, 676-685.
21. SMITH L. & RAMIREZ J.
Reactions of carotenoid pigments in photosynthetic bacteria.
(1960) J. Biol. Chem., 235, 219-225.
22. BALTSCHIEFFSKY M.
Energy conversion-linked changes of carotenoid absorbance in
Rhodospirillum rubrum chromatophores.
(1969) Arch. Biochem. Biophys., 130, 646-652.
23. LUNDEGÅRDH H.
 β carotene as a photoreductone for ferredoxin and trisphosphopyridine
nucleotide in vitro.
(1966) Nature, 209, 606-608.
24. JUNGALWALA F.B. & PORTER J.W.
Biosynthesis of phytoene from isopentenyl and farnesylpyrophosphate
by a partially purified tomato enzyme system.
(1967) Arch. Biochem. Biophys., 199, 209-219.
25. SUBBARAYAN C., KUSHWAHA S.C., SUZUE G. & PORTER J.W.
Enzymatic conversion of isopentenylpyrophosphate 4^{14}C and conversion
of phytoene in carotenoids other than phytofluene by an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
precipitated spinach enzyme system.
(1970) Arch. Biochem. Biophys., 137, 547-557.
26. HERBER R., MAUDINAS B. & VILLOUTREIX J.
Mise en évidence d'isomères trans du phytoène et du phytofluène
chez Rhodopseudomonas spheroides, Rhodospirillum rubrum et Mucor
hiemalis.
(1972) C.R. Acad. Sci., Paris, Ser D, 274, 327-329.
27. LASCELLES J.
The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell
suspensions of Rhodopseudomonas spheroides.
(1956) Biochem. J. 62, 78-93.
28. ORMEROD J.G., ORMEROD K.S. & GEST H.
Light dependent utilization of organic compounds and photoproduction
of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria ; relationships
with nitrogen metabolism.
(1961) Arch. Biochem. Biophys., 94, 449-463.

29. EMERSON E. & KELLY K.

The condensation of aminoantipyrine.

VI - A study of the effect of excess base on the reaction of aminoantipyrine with phenolic compounds in the presence of oxidizing agents. (1948) J. Org. Chem., 13, 532-534.

30. COHEN-BAZIRE G., SISTROM W.R. & STANIER R.Y.

Kinetic studies of pigment synthesis by non sulfur purple bacteria. (1957) J. Cell. Comp. Physiol., 49, 25-68.

31. RABOURN W.J., QUACKENBUSCH F.W. & PORTER J.W.

Isolation and properties of phytoene.

(1954) Arch. Biochem. Biophys., 48, 267-274.

32. KOE B.K. & ZECHMEISTER L.

Preparation and spectral characteristics of all trans and a cis phytofluene.

(1953) Arch Biochem. Biophys., 46, 100-104.

33. NASH H.A., QUACKENBUSCH F.W. & PORTER J.W.

Studies in the structure of zetacarotene.

(1948) J. Am. Chem. Soc., 70, 3613-3615.

34. HAXO F.

Studies on the carotenoid pigments of Neurospora.

I - Composition of the pigment.

(1949) Arch. Biochem., 20, 400-421.

35. GOODWIN T.W., LAND D.G. & SISSINS M.E.

Studies in carotenogenesis. The nature of the carotenoids in the photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas spheroides.

(1956) Biochem. J., 64, 486-492.

36. ISLER O., GUTMANN H., LINDLAR H., MONTAVON M., RUEGG R., RYSER G. & ZELLER P.

Synthesen in der Carotinoid Reihe 6. Synthese von Crocetin aldehyde und Lycopin.

(1956) Helv. Chim. Acta., 39, 463-473.

37. JENSEN S.L.

The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems.

(1962) Detkgl Korsk Videnskabers Selskabs Skrifter Nr 8.

38. POLGAR A., VAN NIEL C.B. & ZECHMEISTER L.

Studies on the pigments of the purple bacteria.

II - A spectroscopic and stereochemical investigation of spirilloxanthin.

(1944) Arch. Biochem., 5, 243-264.

39. THRELFALL D.R. & GOODWIN T.W.
Nature intracellular distribution and formation of terpenoid
quinones in *Euglena gracilis*.
(1967) *Biochem. J.*, 103, 573- 588.
40. LAWSON D.E.M., THRELFALL D.R., GLOVER J. & MORTON R.A.
Biosynthesis of ubiquinone in the Rat.
(1961) *Biochem. J.*, 79, 201-208.
41. PARK C.E. & BERGER L.R.
Complex lipids of *Rhodomicrobium vannielii*.
(1967) *J. Bact.*, 93, 221-229.
42. BARTLETT G.R.
Phosphorus assay in column chromatography.
(1959) *J. Biol. Chem.*, 234, 466-468.
43. RYTER A. & KELLENBERGER E.
Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide
desoxyribonucléique.
I. Les nucléotides des bactéries en croissance active.
(1958) *Z. Naturforschg.*, 136, 597-605.
44. REYNOLD E.S.
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in
electron microscopy.
(1963) *J. Cell. Biol.*, 17, 208- 212.
45. HUXLEY H.E. & ZUBAY G.
Electron microscope observations on the structure of microsomal
particles from *Escherichia coli*.
(1960) *J. Mol. Biol.*, 2, 10-18.
46. VERNON L.P. & GARCIA A.F.
Pigment proteins complexes derived from *Rhodospirillum rubrum*
chromatophores by enzymatic digestion.
(1967) *Biochim. Biophys. Acta.*, 143, 144-153.
47. CLAYTON R.K.
Toward the isolation of a photochemical reaction center in
Rhodopseudomonas spheroides.
(1963) *Biochim. Biophys. Acta.*, 75, 312-323.
48. LOWRY O.H., ROSEBROUGH M.J., FARR M.J. & RANDALL A.L.
Protein measurements with the Folin phenol reagents.
(1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
49. TAKAYAMA K., MAC LENNAN D.H., TZAGOLOFF A. & STONER C.D.
Studies in the electron transfer system.
LXVII - Polyacrylamide gel electrophoresis of the mitochondrial
electron transfer complexes.
(1966) *Arch. Biochem. Biophys.*, 114, 223-230.

50. BAUM H., SILMAN H.J., RIESKE J.S. & LIPTON S.H.
On the composition and structural organization of complex III
of the mitochondrial electron transfert chain.
(1967) J. Biol. Chem., 242, 4876-4887.
51. SEGEN B.J. & GIBSON K.D.
Deficiencies of chromatophore proteins in some mutants of
Rhodopseudomonas spheroides with altered carotenoids.
(1971) J. Bacteriol., 105, 701-709.
52. THROM E., OELZE J. & DREWS G.
The distribution of NADH oxydase in the membrane system of
Rhodospirillum rubrum.
(1970) Arch. Mikrobiol., 72, 361-370.
53. CHON-TÔN-PHAN.
L'éthylène : métabolisme et activité métabolique.
(1971) Masson 83.
54. KHARASH M.S., CONWAY E.A. & BLOOM W.
Effect of diphenylamine on chromogenesis.
(1936) J. Bacteriol., 32, 533-538.
55. TURIAN G.
Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille
paratuberculeux.
III - Inhibition de la pigmentation par la diphénylamine.
(1950) Helv. Chim. Acta., 33, 1988-1993.
56. GOODWIN T.W., LAND D.G. & OSMAN H.G.
Carotenoid synthesis in the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas*
spheroides.
(1955) Biochem. J., 59, 491-496.
57. RILLING H.C.
A study of inhibition of carotenoid synthesis.
(1965) Arch. Biochem. Biophys., 110, 39-46.
58. VILLOUTREIX J.
Influence de divers agents chimiques sur la caroténogénèse de
Rhodotorula mucilaginosa.
(1960) Biochim. Biophys. Acta., 40, 434-441.
59. HERBER R., MAUDINAS B. & VILLOUTREIX J.
Influence de divers agents chimiques sur la caroténogénèse de
Mucor hiemalis.
(1972) Phytochemistry, 11, 3461-3464.
60. VILLOUTREIX J.
Résultats non publiés.

61. NINET L., RENAUT J. & TISSIER R.
Activation of the biosynthesis of carotenoids by *Blakeslea trispora*.
(1969) *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 1195-1210.
62. CONNING D.M., FLETCHER K. & SWAN A.A.B.
Paraquat and related bipyridyls.
(1969) *Brit. Med. Bull.*, 25, 245-249.
63. MAUDINAS B., HERBER R. & VILLOUTREIX J.
Action de différentes substances chimiques sur la caroténogenèse de *Rhodopseudomonas spheroides*.
(1972) *Chem. Biol. Interactions*, 5, 341-350.
64. FAULKNER G.R.
The antibacterial action of some diphenyl derivatives.
(1944) *Biochem. J.*, 38, 370-372.
65. ARCOS J.C. & ARCOS M.
Fortschritte des Arzneimittelforschung.
(1970) Birkhäuser, Basel, 407 (Ed. E. JUCKER).
66. EIMHJELLEN K.E. & JENSEN S.L.
The biosynthesis of carotenoids in *Rhodopseudomonas gelatinosa*.
(1964) *Biochim. Biophys. Acta.*, 82, 21-40.
67. MAUDINAS B., ROLIN H., PIERFITTE M. & VILLOUTREIX J.
Etudes des caroténoïdes de mutants de *Rhodopseudomonas spheroides*.
(1973) *C.R. Soc. Biol.*, à paraître.
68. GRIFFITHS M. & STANIER R.Y.
Some mutational changes in the photosynthetic pigment system of *Rhodopseudomonas spheroides*.
(1956) *J. Gen. Microbiol.*, 14, 698-715.
69. GOODWIN T.W. & OSMAN H.G.
General cultural conditions controlling carotenoid (spirilloxanthin) synthesis in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*.
(1953) *Biochem. J.*, 53, 541-546.
70. JENSEN S.L., COHEN-BAZIRE G., NAKAYAMA T.O.M. & STANIER R.Y.
The path of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium.
(1958) *Biochim. Biophys. Acta.*, 29, 477-498.
71. GOODWIN T.W. & OSMAN H.G.
Spirilloxanthin synthesis by washed cells of *Rhodospirillum rubrum*.
(1954) *Biochem. J.*, 56, 222-230.

72. JUNGALWALA F.B. & PORTER J.W.
The configuration of phytoene.
(1965) Arch. Biochem. Biophys., 110, 291-299.
73. DAVIS J.B., JACKMAN L.M., SIDMONS P.T. & WEEDON B.C.L.
The structure of phytoene, phytofluene, zeta-carotene and neurosporene.
(1966) Proc. Chem. Soc., 2154-2165.
74. ZECHMEISTER L.
Cis-trans isomeric carotenoids, vitamins A and arylpolyenes.
(1962) SPRINGER-VERLAG.
75. DAVIES B.H.
A novel sequence for phytoene dehydrogenation in *Rhodospirillum rubrum*.
(1970) Biochem. J., 116, 93-99.
76. SUZUE G., TSUKADA K. & TANAKA S.
Occurrence of dehydrosqualene (C₃₀ phytoene) in *Staphylococcus aureus*.
(1968) Biochim. Biophys. Acta., 164, 88-93.
77. KUSHWAHA S.C., PUGH E.L., KRAMER J.K.G. & KATES M.
Isolation and identification of dehydrosqualene and C₄₀ carotenoid pigments in *Halobacterium cutirubrum*.
(1972) Biochim. Biophys. Acta., 260, 492-506.
78. WEEDON B.C.L.
Spectroscopic methods for elucidating the structures of carotenoids.
(1969) in Fortschr. Chem. Org. Naturst. XXVII, 82-129.
79. MAUDINAS B., HERBER R., VILLOUTREIX J. & GRANGER P.
Influence du 2-hydroxybiphenyle sur la caroténogénèse de *Rhodospseudomonas spheroides* et de *Rhodospirillum rubrum*.
(1972) Biochimie, 54, 1085-1088.
80. GRANGER P., MAUDINAS B., HERBER R. & VILLOUTREIX J.
¹H and ¹³C NMR spectra of cis and trans phytoene isomers.
(1973) J. Magn. Res., avril, à paraître.
81. DIEHL P. & KELLERHALS H.
Computer assistance in the analysis of high resolution NMR spectra
NMR Basic Principles and Progress, vol. 6.
(1972) Springer Verlag. Ed. DIEHL P., FLUCK E., KOSFELD R.
82. GRANGER P.
Nouvelle méthode de calcul de spectre RMN. Application à une série d'époxydes et calcul des constantes de couplage.
(1969) Thèse Sciences - NANCY.
83. VETTER W., ENGLERT G., RIGASSI N. & SCHWIETER U.
in "Carotenoids" - O. ISLER.
(1971) Birkhäuser, Basel, chap. IV, 236.

84. KHATOON N., LOEBER D.E., TOUBE T.P. & WEEDON B.C.L.
Stereochemistry in phytoene.
(1973) Chem. Com. à paraître.
85. JAUTELAT M., GRUTZNER J.B. & ROBERTS J.D.
Natural abundance of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of terpenes and carotenes.
(1970) Proc. Nat. Acad. Sc., 65, 288-292.
86. DORMAN D.E., JAUTELAT M. & ROBERTS J.D.
Carbone 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Quantitative correlations of the carbon chemical shifts of acyclic alkenes.
(1971) J. Org. Chem. 36, 2757-2766.
87. ENZELL C.R., FRANCIS G.W. & JENSEN S.L.
Mass spectrometric studies of carotenoids.
II - A survey of fragmentation reactions.
(1969) Acta Chem. Scand., 23, 727-750.
88. KLEINIG H., REICHENBACH H. & ACHENBACH H.
Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (*Chondromyces aurantiacus*). Acylated carotenoid glucosides.
(1970) Arch. Mikrobiol., 73, 223-234.
89. HERBER R., MAUDINAS B., VILLOUTREIX J. & GRANGER P.
Formation de phytoène all trans chez *Mucor hiemalis*.
(1972) Biochim. Biophys. Acta., 280, 194-202.
90. MAUDINAS B., HERBER R. & VILLOUTREIX J.
Photoisomérisation du phytoène par la 9-fluorénone.
(1972) Photochem. Photobiol., 16, 515-518.
91. THAN A., BRAMLEY P.M., DAVIES B.H. & REES A.F.
Stereochemistry of phytoene.
(1972) Phytochem., 11, 3187-3192.
92. HAMMOND G.S., TURRO N.J. & LEERMAKERS P.A.
The mechanisms of photoreactions in solution.
IX - Energy transfer from the triplet states of aldehydes and ketones to unsaturated compounds.
(1962) J. Phys. Chem., 66, 1144-1147.
93. VALENTINE D., Jr, & HAMMOND G.S.
Mechanisms of photochemical reactions in solution.
LXVII - Energy wastage in Photosensitized isomerizations of the stilbenes.
(1972) J. Am. Chem. Soc., 94, 3449-3454.

94. HAUSSEK K.W., KUHN R. & SEITZ G.
Lichtabsorption und Doppelbindung.
V - Über die Absorption von Verbindungen mit Konjugierten
Kohlenstoffdoppelbindungen bei Tiefer Temperatur.
(1935) Z. Phys. Chem., 29 B, 391-417.
95. JURKOWITZ D., LOEB J.N., BROWN P.K. & WALD G.
Photochemical and stereochemical properties of carotenoids at low
temperatures.
(1959) Nature, 184, 614-624.
96. KE B., IMSGARD F., KJOSEN H. & JENSEN S.L.
Electronic spectra of carotenoids at 77°K.
(1970) Biochim. Biophys. Acta., 210, 139-152.
97. TRIC C.
La délocalisation des électrons π ; étude des états excités électroniques
et vibrationnels de quelques molécules en chaîne de doubles liaisons
conjuguées.
(1969) Thèse Sciences Paris Orsay.
98. RABINOWITCH E.I.
Photosynthesis (Interscience Publishers New York 1951).
Vol. 2, part I, 798.
99. CHERRY R.J., CHAPMAN D. & LANGELAAR J.
Fluorescence and phosphorescence of β carotene.
(1968) Trans. Far. Soc., 64, 2304-2307.
100. SYKES A. & TRUSCOTT T.G.
The triplet state of lycopene.
(1969) Chem. Comm., 274-276.
101. EVANS D.F.
Magnetic perturbation of singlet triplet transitions.
IV - Unsaturated compounds.
(1960) J. Chem. Soc., 1735-1745.
102. CHESSIN M., LIVINGSTON R. & TRUSCOTT T.G.
Direct evidence for the sensitized formation of a metastable state
of β carotene.
(1966) Trans. Faraday Soc., 62, 1519-1524.
103. PARKER C.A. & JOYCE T.A.
Delayed fluorescence and some properties of the chlorophyll triplets.
(1967) Photochem. Photobiol., 6, 395-406.

104. SIMMONS H.E.
The influence of geometry on the electronic structure and spectra of planar polyenes.
in Prog. Phys. Org. Chem., 7 (1970) 1-50.
Ed. A. STREITWIESER, R.W. TAFT (Interscience Publishers).
105. KASHA M.
Collisional perturbation of spin orbital coupling and the mechanism of fluorescence quenching. A visual demonstration of the perturbation.
(1952) J. Chem. Phys., 20, 71-74.
106. GIACHINO G.C. & KEARNS D.R.
External heavy atom perturbation of vibronic transitions in singlet triplet spectra.
(1970) J. Chem. Phys., 53, 3886-3891.
107. GIACHINO G.C. & KEARNS D.R.
Nature of the external heavy atom effect on radiative and non radiative singlet-triplet spectra.
(1970) J. Chem. Phys., 52, 2964-2974.
108. MATHIS P.
Etude de formes transitoires des caroténoïdes.
(1970) Thèse Sciences. Orsay.
109. Mc GLYNN S.P., AZUMIT G. & KINOSHITA M.
Molecular Spectroscopy of the triplet state.
(1969) Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
110. TRUSCOTT T.G., LAND E.J. & SYKES A.
Absorption spectra, lifetimes, rates of O₂ quenching of the triplet states of β carotene, retinal and related polyenes.
(1973) Photochem. Photobiol., 17, 43-51.
111. LAND E.J., SYKES A. & TRUSCOTT T.G.
The triplet states of β carotene and lycopene excited by pulse radiolysis.
(1971) Photochem. Photobiol., 13, 311-320.
112. COUNSELL R.C., VOGT V. & DALTON C.
Mechanisms of photochemical reactions in solution.
XXII - Photochemical cis trans isomerisation.
(1964) J. Am. Chem. Soc., 86, 3197-3217.
113. SISTROM W.R.
Observations on the relationship between the formation of photo-pigments and the synthesis of protein in Rhodospseudomonas spheroides.
(1962) J. Gen. Microbiol., 28, 599-605.

125. COHEN-BAZIRE G. & STANIER R.Y.
Inhibition of carotenoid synthesis in photosynthetic bacteria.
(1958) Nature, 181, 250-253.
126. JONES O.T.G.
Inhibition of bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodopseudomonas spheroides* by 8 hydroxyquinoline.
(1963) Biochem. J., 88, 335-343.
127. AAGAARD J. & SISTROM W.R.
Control of synthesis of reaction center bacteriochlorophyll in photosynthetic bacteria.
(1972) Photochem. Photobiol., 15, 209-225.
128. REED D.W., RAVEED D. & ISRAEL H.W.
Functional bacteriochlorophyll-protein complexes from chromatophores of *Rhodopseudomonas spheroides* strain R 26.
(1970) Biochim. Biophys. Acta., 223, 281-291.
129. MÜHLETHALER
(1971) Abstr. 2nd Int. Congr. Photosynthesis, Stresa.
130. SISTROM W.R. & CLAYTON R.K.
Studies on a mutant of *Rhodopseudomonas spheroides* unable to grow photosynthetically.
(1964) Biochim. Biophys. Acta., 88, 61-73.
131. HAMMOND R.K. & WHITE D.C.
Inhibition of vitamin K₂ and carotenoid synthesis in *Staphylococcus aureus* by diphenylamine.
(1970) J. Bacteriol., 103, 611-615.
132. SUGIMURA T. & RUDNEY H.
The effect of aerobiosis and diphenylamine on the content of ubiquinone in *Rhodospirillum rubrum*.
(1962) Biochim. Biophys. Acta., 167-170.
133. NUSBAUM-CASSUTO E. & VILLOUTREIX J.
Influence de l'ubiquinone sur la caroténogénèse chez les levures du genre *Rhodotorula*.
(1967) Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 879-887.
134. OLSON J.A. & KNIZLEY H.
The effect of diphenylamine on carotenoid, sterol and fatty acid synthesis in *Phycomyces blakesleeana*.
(1962) Arch. Biochem. Biophys., 97, 138-145.
135. SLECHTA L., GABRIEL O. & HOFFMANN-OSTENHOF O.
Separation of carotenoid synthesis from fat synthesis in *Rhodotorula gracilis* by diphenylamine.
(1958) Nature, 181, 268-269.

136. STEINER S., BURNHAM J.C., CONTI S.F. & LESTER R.L.
Polar lipids of Chromatium D grown at different light intensities.
(1970) J. Bacteriol., 103, 500-503.
137. WOOD B.J.B., NICHOLS B.W. & JAMES A.T.
The lipids and fatty acid metabolism of photosynthetic bacteria.
(1965) Biochim. Biophys. Acta., 106, 261-273.
138. BOLL M.
Action of sodium dodecyl sulfate on electron transfer enzymes
of Rhodospirillum rubrum.
(1970) Experientia, 9, 956-957.
139. CROUNSE J., SISTROM W.R. & NEMSER S.
Carotenoid pigments and the in vivo spectrum of bacteriochlorophyll.
(1963) Photochem. Photobiol., 2, 361-275.
140. FULLER R.C. & ANDERSON I.C.
Suppression of carotenoid synthesis and its effect on the activity
of photosynthetic bacterial chromatophores.
(1958) Nature, 181, 252-254.
141. SISTROM W.R.
The spectrum of bacteriochlorophyll in vivo : Observations on mutants
of Rhodopseudomonas spheroides unable to grow photosynthetically.
(1966) Photochem. Photobiol., 5, 845-856.
142. FUJIMORI E.
Bacteriochlorophyll pheophytinization in chromatophores and
subchromatophores from Rhodospirillum rubrum.
(1969) Biochim. Biophys. Acta., 180, 360-367.
143. SUBDEN R.E. & TURIAN G.
A mechanism for carotenoid synthesis in Fungi involving a multi-
functional enzyme complex.
(1970) Mol. Gen. Genet., 108, 358-364.
144. OELZE J. & DREWS G.
Variations of NADH oxydase activity and bacteriochlorophyll
contents during membrane differentiation in Rhodospirillum rubrum.
(1970) Biochim. Biophys. Acta., 219, 131-140.
145. SCHÖN G. & JANK-LADWIG R.
Veränderung des intracytoplasmischen Membran systems (thylakoide)
von Rhodospirillum rubrum unter Stickstoff-limitierung.
(1972) Arch. Mikrobiol., 85, 319-332.
146. HOLT S.C. & MARR A.G.
Isolation and purification of the intracytoplasmic membranes
of Rhodospirillum rubrum.
(1965) J. Bacteriol., 89, 1413-1420.

147. VALADON L.R.G., HERBER R., VILLOUTREIX J. & MAUDINAS B.
 cis and trans phytoene in *Verticillium Agaricinum*.
 (1973) *Phytochem.*, 12, 161-163.

148. MALHOTRA H.C., BRITTON G. & GOODWIN T.W.
 The mono and dimethoxy carotenoids of diphenylamine inhibited
 cultures of *Rhodospirillum rubrum*.
 (1970) *Phytochem.*, 9, 2369-2375.

149. LANG W. & RAU W.
 Untersuchung über die lichtabhängige Carotinoidsynthese.
 IX - Zum Induktionsmechanismus der carotinoidbildenden Enzyme
 bei *Fusarium aquaeductum*.
 (1972) *Planta*, (Berl), 106, 345-354.

150. BONALY R.
 Biosynthèse des caroténoïdes cycliques du genre *Rhodotorula*.
 (1967) Thèse Sciences Nancy.

151. UFFEN R.L. & WOLFE R.S.
 Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark conditions.
 (1970) *J. Bacteriol.*, 104, 462-472.

UDART ET CLÉMENT

RELIEURS

11, Rue Sainte-Anne
Tél. : 52.80.09 NANCY
